

抗重金属汞离子抗体的制备及鉴定

赵丽^{1,2}, 王凤龙¹, 杨慧², 李鹏², 刘满杏², 李霞^{2,3}

1 内蒙古农业大学动物科学与医学学院, 呼和浩特 010018

2 北京市农林科学院蔬菜研究中心, 北京 100097

3 北京农产品质量检测与农田环境监测技术研究中心, 北京 100097

摘要: 汞、镉、铅等重金属引起的环境污染已在世界范围内造成危害。快速、廉价地监测生境中重金属是减小其对人类及动物危害的先决条件。传统检测方法无法满足高通量的现场检测, 建立更快速、更经济的免疫分析法检测汞离子是生产及经济发展的需要。本研究中, 报道了汞特异性单克隆抗体的制备与筛选方法和结果。因 Hg^{2+} 太小以至于不能引起免疫反应, 所以用螯合剂 (二乙烯三胺五乙酸, DTPA) 将金属离子与载体蛋白 (匙孔血蓝蛋白, KLH) 连接起来。成功合成、鉴定汞复合物抗原后, 免疫 BALB/c 小鼠, 通过细胞融合获得了稳定分泌抗体的杂交瘤细胞。用极限稀释法亚克隆, 通过 ELISA 筛选, 获得了 2 株稳定分泌抗汞离子抗体的细胞株 (H2H5, H1H8)。小鼠腹腔注射 1×10^7 H2H5、H1H8 细胞株制备腹水, 腹水抗体效价都在 1:51 200 以上。经鉴定两株杂交瘤均为 IgG1 亚类, 轻链为 κ 型且分泌抗体稳定性较好。实验结果为汞离子残留免疫学检测方法的建立提供了技术基础, 对提高风险评估工作的效率和质量, 保障食品安全有重要现实意义。

关键词: 汞, 螯合抗原, 单克隆抗体, 酶联免疫吸附法

Preparation and characterization of specific monoclonal antibodies against mercury ions

Li Zhao^{1,2}, Fenglong Wang¹, Hui Yang², Peng Li², Manxing Liu², and Xia Li^{2,3}

1 College of Animal Science and Medicine, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018, China

2 Vegetable Research Center of Beijing Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Beijing 100097, China

3 Beijing Research Center for Agri-food Testing and Farmland Monitoring, Beijing 100097, China

Abstract: The environmental pollution by heavy metals such as mercury, cadmium and lead has become a worldwide public health hazard. To rapidly and inexpensively monitor environmental heavy metals is a prerequisite for minimizing human and animal exposure. The development of immunoassays to detect mercury ion residues has been a promising trend with the advantage of rapid and cheap operation. We reported the isolation and characterization of mercury-specific monoclonal antibodies. Because Hg^{2+} ions are too small to elicit an immune response, the metal was coupled to protein carrier (keyhole limpet, KLH) using a chelator (diethylenetriamine pentaacetic acid, DTPA). After the synthesis of antigen and characterization, monoclonal antibodies against mercury ions were generated by immunizing BALB/c mice with mercury conjugated antigen

Received: December 29, 2009; **Accepted:** April 7, 2010

Supported by: National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (No. 2007AA10Z439), National Natural Science Foundation of China (No. 30671205), Project of Beijing Municipal Science & Technology Commission (No. Z09090501040901).

Corresponding author: Xia Li. Tel: +86-10-51503069; E-mail: lixia@nerev.org

国家高技术研究发展计划 (863 计划) (No. 2007AA10Z439), 国家自然科学基金 (No. 30671205), 北京市科委课题 (No. Z09090501040901) 资助。

(Hg-DTPA-KLH). The stable hybridoma cell lines were produced by fusion of murine splenocytes and SP2/0 myeloma cells. The hybridoma cells were subcloned by the limiting dilution and screened by ELISA, two hybridoma cell lines producing stably specific monoclonal antibodies (MAbs) against mercury ions were obtained, named H2H5 and H1H8. The ascites fluid was produced in BALB/c mice by intraperitoneal injection of 1×10^7 H2H5 and H1H8 cells, respectively. The titers of ascites were all above 1:51 200. The isotyping of secreted antibodies from two hybridoma cell lines was IgG1, κ type. These data laid a potency of establishing immunoassays methods of determining Hg^{2+} ion residues and had the realistic significance for improving the efficiency and quality of risk assessment.

Keywords: mercury, chelated antigen, monoclonal antibody, ELISA

近年来, 重金属污染事件层出不穷、愈演愈烈, 人类赖以生存的空气、土壤、蔬菜和动物均受到了重金属等毒物的污染。环境污染和饲料药物添加剂的滥用, 造成畜禽产品重金属残留不同程度超标^[1]。作物中积累的重金属离子通过食物链的生物放大作用进入人畜体内, 威胁人畜健康^[2]。汞是蓄积作用较强的元素, 主要在动物体内蓄积。湖泊、沼泽中的水生植物、水产品易蓄积大量的汞。上世纪 50 年代后期, 农业上使用含汞杀螨剂以来, 汞对土壤、自然水系和大气的污染日益严重。汞污染在世界的某些地区已成为大众健康的公害^[3]。快速灵敏地检测食物中的重金属含量是保障食品安全的基础, 传统检测重金属残留的分析方法包括原子吸收光谱分析 (Atomic absorption spectroscopy, AAS) 和电感耦合等离子体发射光谱 (Inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy, ICP-AES) 等^[4]是灵敏、可靠的, 但昂贵的仪器、专业的分析人员及复杂的样品前处理限制了这些方法的应用。检测必须在具备大型分析仪器的重点实验室内进行, 无法用于现场检测, 而且受到费用高、处理量有限和检测时间长等限制^[5]。传统的重金属检测方法不适合蔬菜、水果等保鲜期短、利润低和需大通量检测的样品。

国外对重金属免疫检测技术以重金属螯合物特异性单克隆抗体识别重金属或重金属螯合剂抗原为基础, 建立快速检测方法已经有一定的研究成果^[6]。本研究室利用单克隆抗体技术, 研究和建立重金属的免疫学检测方法。并利用其快速、廉价、灵敏和特异性强的优点, 将该方法发展成便于现场检测的便携方法, 从而适用于农畜产品的抽样检测及进出口通关的快速检验^[7]。对提高风险评估工作的效率和质量, 保障食品安全有重要现实意义。本研究报

告了金属汞离子螯合物的单克隆抗体的获得、鉴定方法和结果, 为汞离子残留免疫学检测方法的建立打下了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂

汞离子 (Hg^{2+})、匙孔血蓝蛋白 (KLH)、卵清蛋白 (OVA)、牛血清白蛋白 (BSA)、佐剂 (FCA、FICA)、聚乙二醇 (PEG)、8-氮鸟嘌呤 (8-AG) (美国 Sigma 公司); 螯合剂 DTPA (日本 DOJINDO); DMEM 高糖基础培养基、台盼蓝 (北京索来宝科技有限公司); 四甲基联苯胺 (TMB) (天根生化科技 (北京) 有限公司); 辣根过氧化物酶标记的羊抗小鼠 IgG (IgG-HRP)、辣根过氧化物酶标记的羊抗小鼠 IgM (IgM-HRP) (北京中杉金桥生物技术有限公司); 抗体亚型鉴定试剂盒、Tween-20 (瑞士 Roche 公司); HEPES (北京华美生物工程公司); 胎牛血清 (FBS) (杭州四季青公司); BCA 蛋白质浓度检测试剂盒 (美国 Novagen 公司)。

1.1.2 实验动物

BALB/c 小鼠 (雌性, 6 周龄), 购于中国军事医学科学院实验动物中心。

1.1.3 细胞

SP2/0 小鼠骨髓瘤细胞, 哈尔滨兽医研究所王雪峰赠送。

1.1.4 仪器及其他

可调微量加样器 (法国 Gilson 公司); 酶联免疫分析仪 (美国 Bio-Rad 公司); 全自动洗板机 (美国 AWARENESS Technology 公司); 磁力搅拌器 (北京金辉盛业科技有限公司); 纯水系统、Centricon

YM-30 超滤管 (美国 Millipore 公司); 聚苯乙烯酶联反应板、24 孔、96 孔细胞培养板、细胞培养瓶 (美国 Corning/Costar 公司)。

1.2 方法

1.2.1 抗原的制备与鉴定

Hg-DTPA-KLH: 取 5.65 mg DTPA 加入 1 mL HEPES 缓冲液 (pH 9.73) 中形成 A 液, 转入反应器, 再加入浓度为 3.46 mol/L 的 $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$ 10 μL , 室温下反应 30 min 后同时加入 0.4 mL HEPES 缓冲液 (pH 9.73) 和 1.7 mL 浓度为 5.9 g/L 的 KLH, 调节 pH 至 9.0, 室温下搅拌反应 12 h。偶联反应后, 用预处理的 Centricon YM-30 超滤管对蛋白质复合物进行分离纯化, 除去没有参与反应的 Hg^{2+} 、螯合剂 DTPA 和 Hg-DTPA 复合物。

Hg-DTPA-OVA 的合成方法同上, DTPA-OVA 的合成方法同上用超纯水代替金属离子即可。超滤后用 BCA 试剂盒测定复合物蛋白浓度^[8]。参照国标 GB/T 17141-1997, 用石墨炉原子吸收光谱法检测超滤后的上清、滤过液及 HEPES 液中 Hg^{2+} 浓度^[9]。

1.2.2 小鼠的免疫及融合小鼠的选择

小鼠的免疫: 首免时, 免疫抗原与等体积的弗氏完全佐剂充分混匀后乳化 1~2 h^[10], 每只 BALB/c 小鼠皮下多点注射 200 μg 抗原。3 周后第 2 次免疫, 相同剂量抗原与等体积的弗氏不完全佐剂充分乳化后免疫, 以后每隔 2 周免疫 1 次, 方法同第 2 次免疫。第 3 次免疫及以后每次免疫后 7 d, 尾静脉采血, 分离血清, 测定血清的效价和产生抗体的特异性。

融合小鼠的选择: 用间接 ELISA 法选择融合小鼠, 方法如下: 1) 包被: 用 HBS (10 mmol/L, pH 7.4) 稀释 Hg-DTPA-OVA 和 DTPA-OVA, 并以相同的浓度 5 mg/L 分别包被到 96 孔酶标板上, 50 μL /孔, 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜或 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵化 2 h; 2) 封闭: PBST 洗涤 5 次, 拍干, 按 100 μL /孔加入 3% BSA, 37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭 1 h; 3) 一抗: 洗涤同上, 加入相同的待检血清, 以未免疫小鼠的血清作阴性对照, 50 μL /孔, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵化 1 h; 4) 酶标二抗: 洗涤同上, 辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG/IgM (混合物) 1:5 000 稀释后, 50 μL /孔, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h; 5) 显色: 洗涤同上, 加入显色液 TMB,

50 μL /孔, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 15 min; 6) 终止反应: 按 50 μL /孔加 1 mol/L 盐酸终止反应; 7) 酶标仪上测 OD_{450} 值, 以空白孔调零。按公式计算差异率 $\text{Difference \%} = (\text{OD}_{450} \text{ of Hg-DTPA-OVA} - \text{OD}_{450} \text{ of DTPA-OVA}) / \text{OD}_{450} \text{ of DTPA-OVA} \times 100\%$ 。

1.2.3 细胞融合

融合前 3 d 加强免疫小鼠。融合前 1 d 制备饲养细胞, 将细胞浓度调至 $1 \times 10^5/\text{mL}$, 按 0.1 mL/孔加到 96 孔细胞培养板内, 备用。取小鼠脾脏及处于对数生长期的 SP2/0 骨髓瘤细胞株以 6:1 数量比混合, 用 50% PEG 介导融合, 将融合后的细胞加入到含饲养细胞的培养板中, 0.1 mL/孔, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱培养^[11]。

1.2.4 阳性融合孔的筛选及阳性融合细胞的克隆

待细胞长满孔底的 1/3 后, 检测融合孔上清, 方法同 1.2.2 中融合小鼠的选择, 一抗是细胞上清, 用未融合孔作阴性对照。用极限稀释法克隆阳性细胞, 细胞上清的检测方法同阳性融合孔的筛选。

1.2.5 杂交瘤染色体核型的鉴定^[12]

取对数生长期杂交瘤细胞株 H1H8 和 H2H5, 用终浓度为 0.05~0.1 mg/L 的秋水仙素处理 4~6 h, 收集细胞后用低渗 KCl 溶液处理 30 min, 固定液固定, 滴加细胞悬液到 4 $^{\circ}\text{C}$ 预冷的载玻片上, 室温自然干燥, Giemsa 染色, 经光学显微镜观察, 挑选细胞形态完整染色体分散均匀的细胞计数。每株计数 5 个细胞, 记录染色体数目并算出平均值。

1.2.6 腹水型单克隆抗体的制备

取 8~10 周龄的雌性 BALB/c 小鼠, 腹腔注射石蜡油 (0.5 mL/只), 1~2 周后分别腹腔注射 1×10^6 个杂交瘤 H2H5 和 H1H8, 接种细胞 7~10 d 后密切观察动物的健康状况与腹水征象, 抽取腹水。室温放置 30 min 后, 4 $^{\circ}\text{C}$ 放置 1.5~2 h 后, 12 000 r/min 离心 2 min, 取上清-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备检。梯度稀释腹水型抗体后检测小鼠腹水效价, 检测方法同 1.2.2 中融合小鼠的选择, 一抗是稀释后的腹水。

1.2.7 抗汞离子抗体亚型的鉴定

取出正在培养的杂交瘤 H2H5 和 H1H8 细胞上清, 按 1:50 稀释后, 按照鼠单抗亚型鉴定试剂盒

ISOSTrip™ Monoclonal Antibody Isotyping Kit 说明书操作, 取稀释液 0.15 mL 加入试剂盒小管中, 室温放置 1 min。待其自然溶解后, 轻轻混匀。然后将试剂条插到小管底部, 大约 5 min 后, 当最前端条带在两对“+”中间出现时, 即可见与杂交瘤细胞株所分泌的抗体亚类和轻链类型对应的指示条带所在位置, 从而确定抗体亚型。

1.2.8 杂交瘤分泌抗体稳定性的测定

将杂交瘤细胞株冻存后, 过一段时间再复苏并且连续培养后测抗体效价。检测方法同阳性融合孔的筛选, 用 Hg-DTPA-OVA 包被酶标板, 二抗用辣根过氧化物酶标记的羊抗小鼠 IgG。

2 结果

2.1 抗原的制备与鉴定

超滤后用 BCA 试剂盒测定蛋白浓度, 绘制标准曲线后, 据公式 $y=0.0008x+0.0065 (R^2=0.9995)$ (y 表示 OD_{570} , x 表示蛋白浓度 (mg/L)) 计算出上清中完全抗原 Hg-DTPA-KLH 蛋白浓度为 4.615 g/L, 滤过液中蛋白浓度为 0.01 g/L。

用石墨炉原子吸收光谱法检测 Hg^{2+} 结果: Hg-DTPA-KLH、DTPA-KLH、HEPES 溶液中汞离子的浓度分别为 208 mg/kg、0 mg/kg、0 mg/kg。如果抗原未合成成功, 游离的 Hg^{2+} 或 Hg-DTPA 会随着超滤而被过滤掉, 超滤后的上清中不会含有 Hg^{2+} , 而我们从超滤后的上清中检测出了 Hg^{2+} 且含量较高, 证明抗原合成成功。

2.2 融合小鼠的选择

五免后检测小鼠血清中抗体效价后, 计算各小鼠的差异率的结果显示 1 号小鼠差异率最高。几只小鼠同时产生了抗 DTPA 和 Hg-DTPA 的抗体, 但是 1 号小鼠抗 Hg-DTPA 的抗体水平最高且差异率最大, 说明 1 号小鼠产生针对 Hg^{2+} 的抗体特异性最强, 所以选 1 号小鼠用于融合 (图 1)。

2.3 细胞融合及阳性融合孔的筛选

10 d 后 96 孔细胞培养板中长出肉眼可见的杂交瘤细胞团, 待细胞长满孔底的 1/3 时取细胞上清检测抗体效价, 结果显示杂交瘤 H2H5、3D12、H1H8、

2A11 抗体效价都大于阴性对照的 2.1 倍, 判定为阳性杂交瘤, 且 H2H5、H1H8 的差异率比 2A11、3D12 的差异率大, 4 株细胞上清与 Hg-DTPA-OVA 反应 OD_{450} 值均高于与 DTPA-OVA 反应 OD_{450} 值, 其中 H1H8、H2H5 差异较大 (图 2), 说明这 2 株细胞分泌的抗体针对 Hg^{2+} 离子的特异性较强, 选 H1H8、H2H5 进行亚克隆。

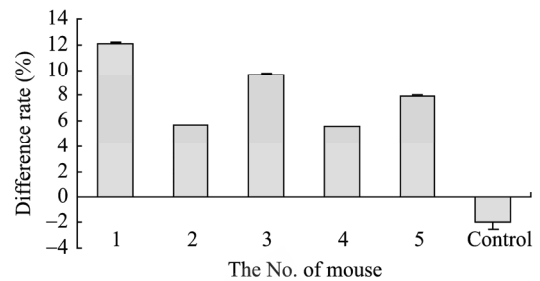


图 1 小鼠五免后的差异率

Fig. 1 Difference rate of the fifth immunized mice.

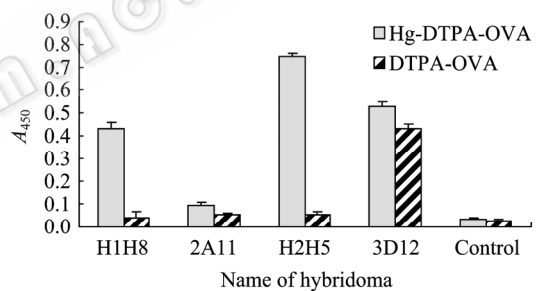


图 2 阳性杂交瘤细胞的筛选

Fig. 2 Selection of the positive hybridomas.

2.4 阳性融合细胞的亚克隆化

H1H8 和 H2H5 经过 2 次亚克隆化后分泌的抗体效价有所升高, 成功获得稳定的分泌抗 Hg^{2+} 单克隆抗体的细胞株, 还可以看出 H2H5 分泌的抗体对金属 Hg^{2+} 的特异性较 H1H8 的强 (图 3)。

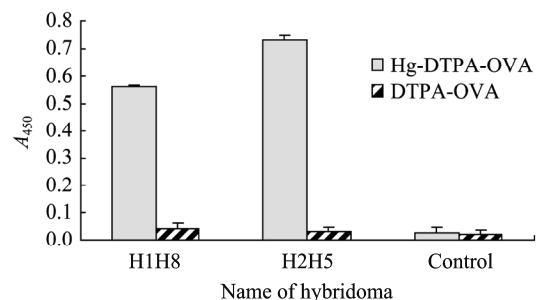


图 3 H1H8 和 H2H5 第二次克隆后细胞上清抗体效价

Fig. 3 Supernatant titer of hybridoma H1H8 and H2H5 after the second cloning.

2.5 杂交瘤细胞染色体核型分析

SP2/0 细胞的染色体数目平均为 68 条, 脾细胞染色体数目平均为 40 条, 而杂交瘤细胞的染色体数目均在 100 以上, 高于 2 个亲本细胞的染色体数目, 说明这 2 株杂交瘤细胞是 SP2/0 细胞和脾细胞的杂交产物。

2.6 腹水型单克隆抗体的制备

取得细胞株 H1H8 和 H2H5 腹水型抗体后检测得出 H1H8 小鼠腹水效价可达 1 : 51 200, 而 H2H5

的效价大于 1 : 51 200 (图 4)。

2.7 抗汞离子抗体 Ig 类和亚类的鉴定

当最前端条带出现在两对“+”中间时, 抗体亚类和轻链指示条带分别在 G1、k 位置, 即细胞株 H1H8 和 H2H5 所分泌的抗体均为 IgG1 亚类, 轻链为 kappa 型 (图 5)。

2.8 杂交瘤分泌抗体稳定性的测定

经检测显示细胞株 H2H5 和 H1H8 分泌抗金属 Hg²⁺ 单克隆抗体的水平未见明显下降 (图 6), 表明

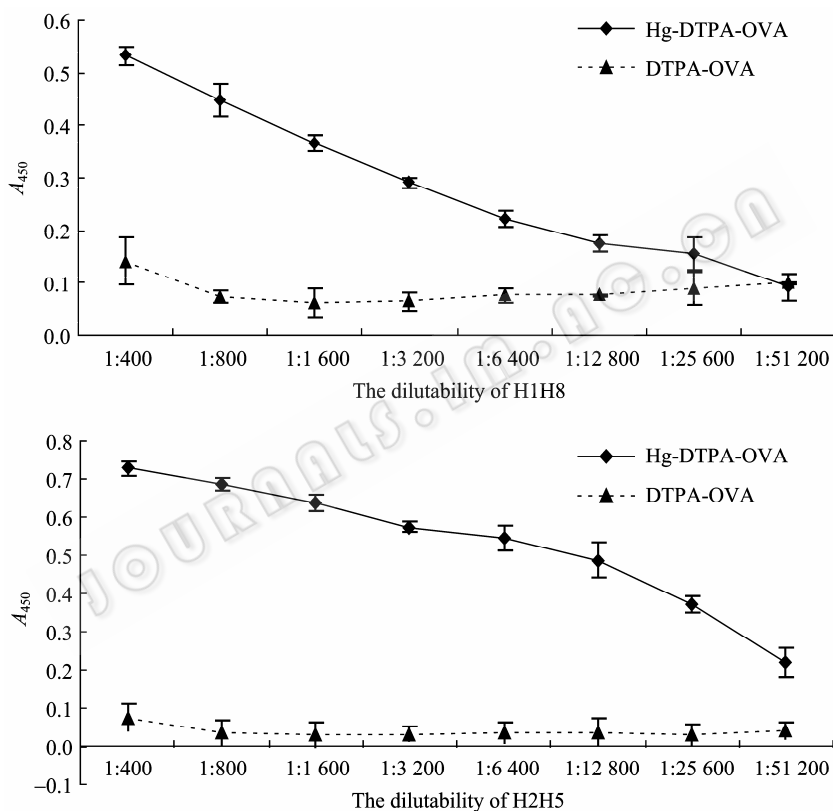


图 4 H1H8 和 H2H5 腹水型单克隆抗体的检测

Fig. 4 Titer of ascites of H1H8 and H2H5.

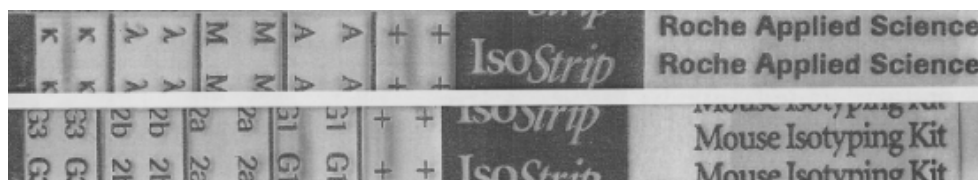


图 5 H1H8 和 H2H5 分泌抗体亚型

Fig. 5 Isotyping of H1H8 and H2H5 secrete antibody.

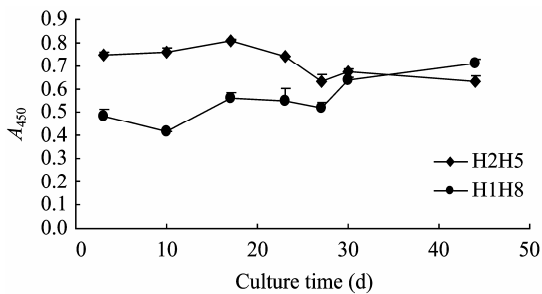


图6 H1H8和H2H5分泌抗体的稳定性

Fig. 6 Stability of H1H8 and H2H5 secreted antibody.

抗体的稳定性较好,同时可证明亚克隆较成功。效价稍有波动,可能是由于取细胞上清复检时间间隔不同以及每次检测之间的误差所致,属正常。

3 讨论

对重金属的常规性检测方法已经有很多种,有些也已经是成熟的技术,但因为重金属离子存在的范围很广,根据检测精度、方便程度和检测成本,每种技术都有其局限性,同时还需合适的场所,因此都不利于在生产中推广应用。本研究所用的免疫学检测技术具有检测速度快、费用低廉、仪器简单易携、灵敏度高和选择性强等优点,可用于现场对重金属进行灵敏、准确、实时、快速的检验分析。免疫分析技术引起人们越来越多的关注,这也是免疫分析技术发展的必然趋势,也是成本低工业化生产所要求的。

由于 Hg^{2+} 能与动物体内生物分子发生强烈的不可逆的反应,导致动物中毒,因此,可利用特异性的双功能螯合剂DTPA螯合 Hg^{2+} ,形成能被动物免疫系统识别的螯合物,但这些重金属复合物是分子量低于1 kDa的半抗原,免疫原性低,不足以引起免疫反应^[13]。DTPA除了能螯合金属离子之外,还能与载体蛋白偶联,可以成功制备重金属汞的包被抗原和免疫抗原^[14-15]。有多种蛋白质如KLH、BSA、OVA等能作为载体蛋白,但从诱发免疫应答的角度来看,KLH的免疫原性优于BSA、OVA等,因此本研究用KLH作为载体蛋白来免疫小鼠以期产生更强的免疫应答。

重金属 Hg^{2+} 单克隆抗体制备的关键在于重金属

免疫原的制备,所以对免疫原鉴定后再免疫小鼠是成功得到重金属单克隆抗体的保证。本研究先用BCA法测定了超滤后上清中的重金属复合物蛋白浓度,然后用石墨炉原子吸收光谱法检测其中的 Hg^{2+} 含量,这为之后重金属 Hg^{2+} 的单克隆抗体的成功制备提供了可靠的保证。

本研究根据差异率筛选融合所用小鼠,差异率越大说明产生针对 Hg^{2+} 的抗体特异性越强,融合筛选得到阳性杂交瘤细胞的几率就越大。

本研究成功获得了抗重金属 Hg^{2+} 或 Hg-DTPA 的单克隆抗体,目前正在纯化抗体并对抗体的各项性能进行鉴定。该工作的完成为其他抗重金属抗体的制备提供了可行的方法,也为重金属免疫检测方法的建立及应用(如ELISA方法、免疫胶体金快速诊断法^[16]等)奠定了基础。

REFERENCES

- [1] Pang RY. Livestock and poultry products quality safety problems and countermeasures in China. *J Heilj Grain*, 2007(4): 20-22.
逢瑞玥. 我国畜禽产品质量安全存在的问题及应对策略. 黑龙江粮食, 2007(4): 20-22.
- [2] Lang ML, Zhang YX, Chai TY. Advances in the research of genetic engineering of heavy metal resistance and accumulation in plants. *Chin J Biotech*, 2004, 20(2): 157-164.
郎明林, 张玉秀, 柴团耀. 基因工程改良植物重金属抗性 with 富集能力的研究进展. 生物工程学报, 2004, 20(2): 157-164.
- [3] Mei GQ. Harmfulness and treatment of heavy metal waste water. *Stud Trace Elem Health*, 2004, 21(4): 54-56.
梅光泉. 重金属废水的危害及治理. 微量元素与健康研究, 2004, 21(4): 54-56.
- [4] Bontidean I, Lloyd JR, Hobman JL, et al. Bacterial metal-resistance proteins and their use in biosensors for the detection of bioavailable heavy metals. *J Inorg Biochem*, 2000, 79(1/4): 225-229.
- [5] Liu GL, Wang JF, Li ZY, et al. Advances in heavy metal ions immunoassay. *Chin J Biotech*, 2006, 22(6): 877-881.
刘功良, 王菊芳, 李志勇, 等. 重金属离子的免疫检测研究进展. 生物工程学报, 2006, 22(6): 877-881.
- [6] Blake DA, Jones RM, Blake II RC. Antibody-based sensors for heavy metal ions. *Biosens Bioelectron*, 2001,

- 16(9-12): 799–809.
- [7] Blake RC, Delehanty JB, Khosraviani M. Allosteric binding properties of a monoclonal antibody and its Fab fragment. *Biochemistry*, 2003, **42**(2): 497–508.
- [8] Robert C, Blake II, Andrey R, *et al.* Novel monoclonal antibodies with specificity for chelated uranium(VI): isolation and binding properties. *Bioconjugate Chem*, 2004, **15**(5): 1125–1136.
- [9] Khosraviani M, Pavlov AR, Flowers GC, *et al.* Detection of heavy metals by immunoassay: optimization and validation of a rapid, portable assay for ionic cadmium. *Environ Sci Technol*, 1998, **32**(1): 137–142.
- [10] Palmarini M, Murgia C, Fan H. Spliced and prematurely polyadenylated Jaagsiekte sheep retrovirus(JSRV)-specific RNAs from infected or transfected cells. *Virology*, 2002, **294**(1): 180–188.
- [11] Li FK, Wang CY. *Experimental Animals and Animal Experiments Methodology*. Zhengzhou: Zhengzhou University Press, 2007: 377.
李凤奎, 王纯耀主编. 实验动物与动物实验方法学. 郑州: 郑州大学出版社, 2007: 377.
- [12] Situ ZQ. *Cell Culture*. Xi'an: World Books Publishing House, 2007: 242.
司徒镇强主编. 细胞培养. 西安: 世界图书出版社, 2007: 242.
- [13] Yu HN, Jones RM, Blake DA. An immunosensor for autonomous in-line detection of heavy metals: validation. *Int J Environ Anal Chem*, 2005, **85**(12/13): 817–830.
- [14] Darwish IA, Blake DA. One-step competitive immunoassay for cadmium ions: development and validation for environmental water samples. *Anal Chem*, 2001, **73**(8): 1889–1895.
- [15] Darwish IA, Blake DA. Development and validation of a one-step immunoassay for determination of cadmium in human serum. *Anal Chem*, 2002, **74**(1): 52–58.
- [16] Chen FM, Li J, Qu YJ, *et al.* Application and research progress of the immune colloidal gold technique. *Chin J Veter Drug*, 2004, **38**(8): 33–35.
陈凤梅, 李娟, 曲原君, 等. 免疫胶体金的研究进展及应用. 中国兽药杂志, 2004, **38**(8): 33–35.

《生物工程学报》对摘要的写作要求

1. 研究报告摘要: 基本要素包括研究目的、方法、结果和结论(不用单列标题书写)。目的(Purpose): 主要说明作者写此文章的目的, 或说明本文主要要解决的问题; 方法(Methods): 重点说明作者的主要工作过程及使用的方法。应用性文章如需要, 可注明条件、使用的主要设备和仪器。结果(Results): 本文最后得出的结果(实验数据部分)。结论(Conclusions): 如为基础研究, 应写明本文的创新之处, 及文章在讨论部分表述的观点; 如为应用性研究, 应尽可能提及本文结果和结论的应用范围和应用情况或应用前景。

2. 综述摘要: 包括论述内容的发展水平、自己的评论及展望, 尤其要注意结合自己的研究工作。

3. 英文摘要的撰写要点: 英文摘要的内容应与中文摘要一致, 但比中文摘要更详尽。英文摘要完成后, 务必请英文较好、且专业知识强的专家审阅定稿后再返回编辑部。凡不符合要求的, 即使学术上可以达到刊出的水平, 本刊也将推迟发表。

(1) 建议使用第一人称, 尽量不使用第三人称和被动语态。

(2) 建议用主动语态, 被动语态表达拖拉模糊尽量不用, 这样可以免好多长句, 以求简单清晰。

(3) 尽量使用清晰简练的短句, 避免很长的句子。注意正确使用英文写作习惯和语法。

(4) 摘要应当使用过去时态, 语法正确, 句子通顺。

(5) 摘要中避免使用缩写语, 除非是那些人人皆知的(如DNA、ATP等), 或者确实是非常长, 而且出现多次的短语才允许用缩写语, 并且在第一次出现时要写出全称。

(6) 在英语摘要中, 不要使用任何汉字字符, 包括标点、括号、温度、希腊字母等。

(7) 句子的开头处最好不要使用数字。