

环境科学

(HUANJING KEXUE)

ENVIRONMENTAL SCIENCE

第36卷 第11期

Vol.36 No.11

2015

中国科学院生态环境研究中心 主办
科学出版社 出版



目次

北京市大气气溶胶中糖类化合物的组成及来源	梁林林, Guenter Engling, 段凤魁, 马永亮, 程远, 杜祯宇, 贺克斌 (3935)
北京大气 PM _{2.5} 与惰性 SiO ₂ 的生物毒性比较	刘梦娇, 黄艺, 文航, 邱国玉 (3943)
APEC 期间北京及周边城市 AQI 区域特征及天气背景分析	高庆先, 刘俊蓉, 王宁, 李文涛, 高文康, 苏布达 (3952)
2000 ~ 2014 年北京市 SO ₂ 时空分布及一次污染过程分析	程念亮, 张大伟, 李云婷, 陈添, 李金香, 董欣, 孙瑞雯, 孟凡 (3961)
利用 SPAMS 研究石家庄市冬季连续灰霾天气的污染特征及成因	周静博, 任毅斌, 洪纲, 路娜, 李治国, 李雷, 李会来, 靳伟 (3972)
长江三角洲夏季一次典型臭氧污染过程的模拟	张亮, 朱彬, 高晋徽, 康汉青, 杨鹏, 王红磊, 李月娥, 邵平 (3981)
珠江三角洲区域污染分布及其垂直风场特征	刘建, 吴兑, 范绍佳 (3989)
春季黄渤海海水中尿素分布特征及溶解态氮的组成	李志林, 石晓勇, 张传松 (3999)
洱海流域农业用地与入湖河流水质的关系研究	庞燕, 项颂, 储昭升, 薛力强, 叶碧碧 (4005)
大辽河主要污染源营养盐输入特征	马迎群, 张雷, 赵艳民, 秦延文, 潘晓雪, 曹伟, 刘志超, 杨晨晨 (4013)
三峡库区大宁河沉积物营养盐时空分布及其与叶绿素的相关性分析	张永生, 李海英, 任家盈, 卢佳 (4021)
不同地质背景水库区夏季水-气界面温室气体交换通量研究	李建鸿, 蒲俊兵, 孙平安, 袁道先, 刘文, 张陶, 莫雪 (4032)
周丛生物存在下不同水层氧化还原带的分布及其与微生物的关联	王逢武, 刘玮, 万娟娟, 杨嘉利, 刘雪梅, 向速林, 吴永红 (4043)
华北低平原区地下水中氟分布特征及形成原因: 以南皮县为例	孔晓乐, 王仕琴, 赵焕, 袁瑞强 (4051)
某市典型地段地表水及地下水中氟喹诺酮类抗生素分布特征	崔亚丰, 何江涛, 苏思慧, 杨蕾, 乔肖刚 (4060)
乳山湾邻近海域沉积物中好氧氨氧化微生物分布特征	贺惠, 甄毓, 米铁柱, 张玉, 付璐璐, 于志刚 (4068)
青木关地下河中溶解态甾醇来源及迁移、转化特征	梁作兵, 沈立成, 孙玉川, 王尊波, 江泽利, 张媚, 廖昱, 谢正兰, 张远瞩 (4074)
多环芳烃在岩溶地下表层沉积物-水相的分配	蓝家程, 孙玉川, 肖时珍 (4081)
降雨期间岩溶地下河溶解态多环芳烃变化特征及来源解析	江泽利, 孙玉川, 王尊波, 梁作兵, 任坤, 谢正兰, 张媚, 廖昱 (4088)
重庆南山老龙洞地下河系统重金属分布、迁移及自净能力	任坤, 梁作兵, 于正良, 张宇, 王蓉, 袁道先 (4095)
三峡水库消落带植物汞的分布特征	梁丽, 王永敏, 李先源, 唐振亚, 张翔, 张成, 王定勇 (4103)
物理和生物组合扰动对底泥微界面过程的影响	王忍, 李大鹏, 黄勇, 刘焱见, 陈俊 (4112)
超声、过硫酸钾协同去除水中诺氟沙星的效果	魏红, 史京转, 李佳霖, 李克斌, 赵琳, 韩凯 (4121)
载银活性炭活化过硫酸钠降解酸性橙 7	王忠明, 黄天寅, 陈家斌, 李文卫, 张黎明 (4127)
TiO ₂ 降解迪美唑的动力学及活性物质分析	陈冬梅, 喻泽斌, 孙蕾, 黄俊, 高丽红, 李明洁 (4135)
单宁酸铁吸附去除水中无机氮的性能与机制研究	张瑞娜, 李琳, 刘俊新 (4141)
间歇曝气式膜生物反应器对养猪沼液中兽用抗生素的去除特性	丁佳丽, 刘锐, 郑炜, 宋小燕, 余卫娟, 叶朝霞, 陈吕军, 张永明 (4148)
单级和两级串联臭氧-生物活性炭深度处理垃圾渗滤液比较研究	杜安静, 范举红, 刘锐, 邱松凯, 文晓刚, 陈吕军 (4154)
水力停留时间和溶解氧对陶粒 CANON 反应器的影响	王会芳, 付昆明, 左早荣, 仇付国 (4161)
氨氮对 AOB 抑制的形态及规律	崔剑虹, 李祥, 黄勇, 朱亮, 杨朋兵 (4168)
厌氧氨氧化与反硝化协同脱氮处理城市污水	张诗颖, 吴鹏, 宋吟玲, 沈耀良, 张婷 (4174)
同步硝化反硝化耦合除磷工艺的快速启动及其运行特征	冷璐, 信欣, 鲁航, 唐雅男, 万利华, 郭俊元, 程庆锋 (4180)
HCO ₃ ⁻ 对部分亚硝化-厌氧氨氧化联合工艺脱氮效能的影响	李祥, 陈宗姮, 黄勇, 袁怡, 刘忻, 张大林 (4189)
ABR 耦合 CSTR 一体化工艺好氧颗粒污泥亚硝化性能调控及稳态研究	巫恺澄, 吴鹏, 沈耀良, 李月寒, 王建芳, 徐乐中 (4195)
活化过硫酸盐对市政污泥调理效果的影响	徐鑫, 濮文虹, 时亚飞, 虞文波, 张诗楠, 宋健, 张昊, 何姝, 杨昌柱, 杨家宽 (4202)
温度分化对 APBR 反应器性能及产甲烷菌群落的影响	谢海迎, 汪鑫, 李牧原, 阎叙西, 五十岚泰夫, 罗锋 (4208)
污染场地修复技术筛选方法及应用	白利平, 罗云, 刘俐, 周友亚, 颜增光, 李发生 (4218)
基于 Monte Carlo 模拟的土壤重金属综合风险评价与案例分析	杨阳, 代丹, 蔡怡敏, 陈卫平, 侯瑜, 杨锋 (4225)
大港工业区土壤重金属污染及生态风险评价	张倩, 陈宗娟, 彭昌盛, 李发生, 谷庆宝 (4232)
缙云山不同土地利用方式对土壤团聚体微生物量碳氮的影响	李增全, 江长胜, 郝庆菊 (4241)
不同秸秆翻埋还田对旱地和水田土壤微生物群落结构的影响	兰木岭, 高明 (4252)
生草果园土壤微生物群落的碳源利用特征	杜毅飞, 方凯凯, 王志康, 李会科, 毛鹏娟, 张向旭, 王婧 (4260)
不同有机物料对东南景天修复重金属污染土壤效率的影响	姚桂华, 徐海舟, 朱林刚, 马嘉伟, 柳丹, 叶正钱 (4268)
组配改良剂对土壤-蔬菜系统铅镉转运调控的场地研究	朱维, 刘丽, 吴燕明, 周航, 邓贵友, 杨文骏, 彭佩钦, 曾敏, 廖柏寒 (4277)
水稻品种及典型土壤改良措施对稻米吸收镉的影响	王美娥, 彭驰, 陈卫平 (4283)
大庆湖泊群水体和淡水鱼中多环芳烃污染特征及生态风险评估	王晓迪, 臧淑英, 张玉红, 王凡, 杨兴, 左一龙 (4291)
覆盖层甲烷氧化动力学和甲烷氧化菌群落结构	邢志林, 赵天涛, 高艳辉, 何芝, 杨旭, 彭绪亚 (4302)
阳极内添加阳离子交换树脂提升铝压“三合一”膜电极 MFC 性能	梅卓, 张哲, 王鑫 (4311)
应用基于单克隆抗体的免疫传感器检测环境中的茚和苯并茚	李鑫, 乔琰, 钟国祯 (4319)
《环境科学》征订启事 (4224) 《环境科学》征稿简则 (4318) 信息 (4080, 4173, 4290, 4301)	

应用基于单克隆抗体的免疫传感器检测环境中的芘和苯并芘

李鑫, 乔琰, 钟国祯

(西南大学材料与能源学部, 重庆 430062)

摘要: 多环芳烃是一类普遍存在的环境污染物, 可以诱发癌症, 对人们的健康造成严重威胁. 本研究利用一种四环芳烃芘的衍生物作为半抗原, 利用活泼酯法合成人工抗原免疫小鼠研制多环芳烃单克隆抗体. 通过非竞争性 ELISA 与竞争性 ELISA 相结合的筛选方式得到一株单克隆抗体, 命名为 6A6. 该抗体能特异性识别芘和苯并芘, 其 IC_{50} 值分别为 $8.1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $6.8 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 对其他多环芳烃的交叉反应率均低于 5%. 在此基础上, 建立了免疫传感器法对芘和苯并芘进行检测, 线性范围为 $0.2 \sim 10.0 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. 利用该方法对添加在水样中的样品进行回收, 并与传统 ELISA 方法进行比对, 结果证明传感器法检测更加快速且灵敏度更高. 该方法可以用于含有芘和苯并芘的环境样品的快速筛选, 可以在 10 min 内初步获得检测结果.

关键词: 苯并芘; 芘; 单克隆抗体; 免疫检测; 传感器

中图分类号: X830.2 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2015)11-4319-06 DOI: 10.13227/j.hjks.2015.11.049

Development of a Monoclonal Antibody-Based Sensor for Environmental Pyrene and Benzo(a) pyrene Detection

LI Xin, QIAO Yan, ZHONG Guo-zhen

(Faculty of Materials and Energy, Southwest University, Chongqing 430062, China)

Abstract: Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are common environmental pollutants which are concerned because several of its members have been known to be carcinogenic and mutagenic. Pyrene, as a kind of PAHs, was covalently linked to carrier protein bovine serum albumin by active ester method and immunized to mice. A sensitive mAb 6A6 was developed by a three-step screening procedure. The IC_{50} of 6A6 against pyrene and benzo(a) pyrene were $8.1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ and $6.8 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, respectively. The cross-reactivity values (CR) with other PAHs were less than 5%. An immunosensor was developed based on 6A6 for pyrene and benzo(a) pyrene detection with a linear range of $0.2 \sim 10.0 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. The assessment of spiked water samples by the sensor demonstrated faster and more sensitive than ELISA method. We believe that this sensor can be used to rapidly assess pyrene and benzo(a) pyrene in environmental samples.

Key words: pyrene; benzo(a) pyrene; monoclonal antibody; immunoassay; sensor

多环芳烃 (polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs) 是指具有两个或者两个以上苯环的有机化合物, 是一类重要的环境污染物^[1,2]. 多环芳烃由于具有致癌性, 致畸性以及致突变性近年来引起科学界的广泛关注^[3,4]. 多环芳烃在自然界中广泛存在, 大气、土壤和水体中都不同程度地含有多环芳烃. 而这些污染可以通过食物链向人体转移, 最终都有可能聚集在人体中, 对人们的身体健康造成严重威胁. 因此, 实时监测环境中多环芳烃的含量非常重要.

传统的多环芳烃检测方法主要有高效液相色谱分析法以及气相色谱-质谱分析法^[5,6]. 这些检测方法虽然准确性好, 但是仪器操作复杂, 成本高, 具有一定的局限性. 而且, 这些方法大都耗时很长, 很难达到环境样品实时监测的目的. 以单克隆抗体为基础的免疫分析方法由于具有成本低, 操作简单, 检测

快速等特点而被越来越广泛地应用^[7-9]. Matschulat 等^[10]开发出一种单克隆抗体, 用于检测水中的苯并芘含量, 检测灵敏度 (IC_{50}) 可以达到 $24 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$. Pschenitza 等^[11]利用固相萃取与 ELISA 结合的方法检测食用油中的苯并芘, 其检测下限可以达到 $0.63 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$.

由美国 Sapidyne 公司研发的 KinExA 系列传感器是一种由计算机掌控的流式荧光计. 其原理与竞争性酶联免疫分析法 (ELISA) 类似, 不同之处在于应用于仪器的抗体需要预先荧光化. 在检测过程中, 通过计算机控制使样品与抗体混合并达到结合平衡. 然后这种溶液快速流过包被有固定化抗原的

收稿日期: 2015-03-04; 修订日期: 2015-06-29

基金项目: 西南大学博士基金项目 (SWU20700901); 中央高校基本科研业务费专项 (XDJK2013C022)

作者简介: 李鑫 (1983 ~), 女, 博士, 讲师, 主要研究方向为小分子污染物的免疫快速检测, E-mail: lixin999@swu.edu.cn

聚甲基丙烯酸甲酯小球,这时候还具有抗原结合位点的抗体被玻璃小珠俘获,通过计算机界面来检测和记录被俘获的抗体的荧光信号,与标准曲线对照得出待测样品的浓度.该仪器已经成功应用于重金属以及多氯联苯的快速检测^[12,13].本研究研制了一种多环芳烃单克隆抗体,并成功将其应用于生物传感器,通过建立灵敏、快速的多环芳烃免疫检测方法,以期实现多环芳烃环境样品的实时监测.

1 材料与方法

1.1 实验试剂与仪器

匙孔血蓝蛋白(keyhole limpet hemocyanin, KLH)、牛血清白蛋白(bovine serum albumen, BSA)、*N,N*-二甲基甲酰胺(*N,N*-dimethylformamide, DMF)、二环己基碳化二亚胺(dicyclohexylcarbodiimide, DCC)以及氮羟基琥珀酸(nhydroxysuccinimide, NHS)均购自美国 Pierce 公司.多环芳烃标准品苯并芘(benzo(a)pyrene)、芘(pyrene)、䓛(chrysene)、菲(phenanthrene)、萘(naphthalene)以及1-芘丁酸(1-pyrene butyric acid, PBA)均购自美国 Sigma 公司;AlexaFluor647 免疫荧光染色试剂盒购自 Invitrogen 公司;其余试剂均购自美国 Fisher 公司.

酶标仪(405 nm):美国 Fisher Scientific 公司;自动洗板机:美国 Biotek 公司;96 孔细胞培养板和 96 孔酶标板:美国 Costar;CO₂ 培养箱:美国 Fisher Scientific 公司.

1.2 方法

1.2.1 人工抗原的制备^[14]

称取 PBA 溶解于适量 DMF 中,致终浓度为 1 mg·mL⁻¹,加入等摩尔质量的 NHS 和 DCC,缓慢加入到上述 DMF 溶液中,4℃ 反应过夜,12 000 r·min⁻¹,离心 15 min 去沉淀,即得活化后的半抗原.称取适量 BSA,溶解于磷酸缓冲液中,致终浓度为 1 mg·mL⁻¹.将 1 mL 活化后的半抗原缓慢加入到 BSA 溶液中,室温下振荡反应 4 h 后将反应物装入透析袋,0.01 mol·L⁻¹ PBS 4℃ 透析 72 h.同样方法制得 PBA 与 KLH 的偶联物,用作抗体筛选的包被抗原.二喹啉甲酸(BCA)法测定偶联物中蛋白浓度.分别称取一定量的 PBA、BSA 以及它们的偶联物,配成一定浓度的溶液,PBA 以甲醇为空白,BSA 和复合物以磷酸缓冲液为空白,在 250~450 nm 波长范围内进行紫外扫描,分析扫描图谱^[15].

1.2.2 小鼠免疫与细胞融合

将 PBA-BSA 偶联抗原溶解于磷酸缓冲液中,与等体积弗氏完全佐剂混合均匀后,背部多点注射 4 只 BALB/c 小白鼠,每只小鼠注射约 50 μg PBA-BSA.6 周后,断尾采血,间接 ELISA 法测定抗血清效价^[16].选取抗血清效价最高的小鼠在融合 3 d 前进行加强免疫,用约 20 μg PBA-BSA 溶于 0.3 mL 磷酸缓冲液中进行尾静脉注射.融合当天,分离小鼠脾细胞,与 SP2/0 骨髓瘤细胞按 8:1 比例混合,在 PEG 作用下融合^[17,18].融合后细胞置于 96 孔细胞培养板中,37℃,CO₂ 培养箱进行培养.

1.2.3 单克隆抗体的筛选

采用三步法对融合后的杂交瘤细胞进行筛选^[19].首先以 PBA-KLH 为包被原,间接 ELISA 方法筛选 PBA 阳性细胞株;然后以原始半抗原 PBA 作为抑制剂,间接竞争 ELISA 方法进一步筛选获得能识别 PBA 单体的细胞株;最后,分别以无取代基的三环至五环芳烃单体作为抑制剂,筛选获得对不同多环芳烃同时具有识别能力的杂交瘤细胞株.有限稀释法亚克隆 3 次以后,利用 Protein A 免疫亲和柱对单克隆抗体进行纯化.

1.2.4 单克隆抗体性质鉴定

利用 Sigma 公司的单克隆抗体亚型鉴定试剂盒对抗体亚型进行鉴定^[20].利用间接竞争 ELISA 方法测定单克隆抗体对不同苯环数量的多环芳烃苯并芘(5 环)、芘(4 环)、䓛(4 环)、菲(3 环)和萘(2 环)的竞争抑制曲线,根据曲线计算抗体对不同多环芳烃的灵敏度(IC₅₀).选取免疫原芘(pyrene)作为参照毒素计算抗体对不同多环芳烃的交叉反应率(交叉反应率% = IC_{50 pyrene}/IC_{50 other PAH} × 100%)^[21].

1.2.5 生物传感器检测体系的建立

以筛选得到的多环芳烃单克隆抗体为基础,使用美国 Sapidyne 公司出产的 KinExA 生物传感器建立多环芳烃检测体系,仪器原理及测定方法见文献^[22].简要说来,首先用 PBA-KLH 包被聚甲基丙烯酸甲酯小球制成固定化抗原,同时,使用荧光染料 AlexaFluor647 标记多环芳烃单克隆抗体^[23].设置自动化进样程序:抗体 400 μL,样品 400 μL,混合均匀后,混合液 400 μL 快速流过固定化抗原,670 nm 检测固定化抗原俘获的抗体荧光信号.

1.2.6 检测标准曲线的建立

为比较分析传感器法与间接竞争 ELISA 法,分别建立两种不同检测方法的标准曲线.以 PBA-KLH 的偶联物为检测抗原,分别包被聚甲基丙烯酸

甲酯小球 (传感器法) 以及 96 孔酶标板 (ELISA 法), 1% BSA 封闭. 以系列浓度苯并茈和茈作为标准溶液, 根据确定的最佳的抗原包被浓度以及抗体工作浓度, 分别利用传感器法和间接竞争 ELISA 方法, 检测不同浓度多环芳烃标准品溶液的电压值/吸光值除以零标准品浓度的电压值/吸光值, 再乘以 100%, 得到抗体对不同标准品的抑制百分比. 以 PAH 标准品浓度 ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) 的对数值为横坐标, 抑制百分比为纵坐标, 绘制标准曲线^[24].

1.2.7 样品添加回收实验

为了验证传感器法检测多环芳烃的准确性, 在经测定不含多环芳烃的自来水中分别添加不同浓度的苯并茈和茈的标准品 (5.0 、 2.0 和 $0.5\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$). 同时应用传感器法和 ELISA 法对加标样品进行测定, 从标准曲线上求出待检样品的多环芳烃浓度, 根据公式计算添加回收率 (回收率% = 实测浓度/添加浓度 $\times 100\%$).

2 结果与分析

2.1 人工抗原偶联产物分析

PBA-BSA 偶联产物经 4°C PBS 溶液透析 3d 后, 除去未反应的 PBA, $250\sim 450\ \text{nm}$ 紫外扫描获得偶联产物的紫外光谱 (图 1). 可见, PBA 在 $305\ \text{nm}$ 和 $347\ \text{nm}$ 处有两个吸收峰, BSA 在 $278\ \text{nm}$ 处有一吸收峰, 而偶联产物在 $300\ \text{nm}$ 和 $355\ \text{nm}$ 处出现了特征吸收峰. PBA-BSA 与其前体物具有不同的紫外吸收特征, 表明 PBA 与 BSA 偶联成功.

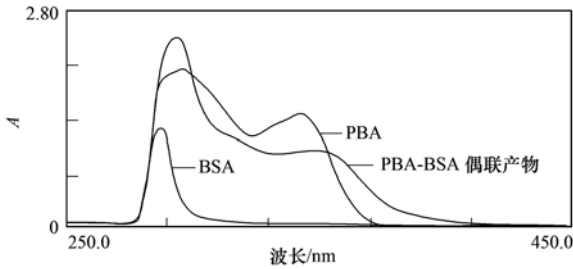


图 1 PBA、BSA 与 PBA-BSA 偶联产物紫外扫描

Fig. 1 UV spectrum of PBA, BSA and PBA-BSA conjugate

2.2 小鼠抗血清效价测定

以 PBA-KLH 为包被原, 梯度稀释免疫 6 周后的小鼠抗血清, 间接 ELISA 方法测定抗血清效价. 选取血清对包被原最大吸光值的一半的点作为抗血清效价 (图 2). 从图 2 中可以看出, 4 只免疫后的小鼠对 PAB-KLH 均有不同的识别, 血清效价均达到了 10^4 以上, 该结果也再次证明了人工抗原的成功合成. 选取抗血清效价最高的小鼠 D, 效价 8.3×10^4 ,

作为实验小鼠进行后续的细胞融合.

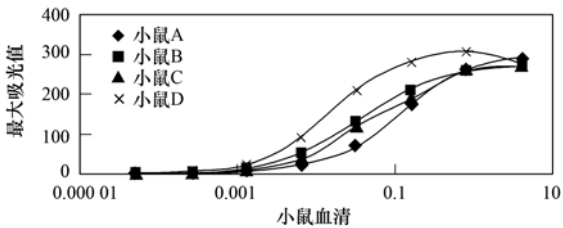


图 2 间接 ELISA 测定四只免疫小鼠的血清效价

Fig. 2 Titer curves of 4 mice anti-sera by indirect ELISA

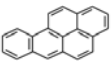
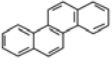
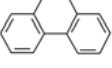
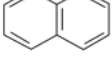
2.3 单克隆抗体鉴定

将 SP2/0 瘤细胞与小鼠 D 脾细胞融合, 液体培养基法筛选融合后的杂交瘤细胞. $12\sim 15\ \text{d}$ 后获得杂交瘤细胞约 563 株. 经第一步非竞争 ELISA 筛选后, 共获得 OD 值为 1.8 以上的阳性克隆 36 株. 进一步通过竞争 ELISA 筛选获得对多环芳烃具有良好识别能力的阳性菌株 4 株. 经过三轮亚克隆, 最终选取一株能稳定分泌抗体的, 并且对多种多环芳烃同时具有识别能力的细胞株作为研究对象进行进一步鉴定. 该细胞株名为 6A6.

通过单克隆抗体亚型鉴定试剂盒, 测得 6A6 分泌的抗体类型为 IgG2a 型. 间接竞争 ELISA 方法对 6A6 灵敏度以及特异性进行测定. 由表 1 可见, 6A6 能灵敏识别茈和苯并茈, 其灵敏度 (IC_{50} 值) 分别为 $8.1\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $6.8\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. 另外, 选取几种典型的二环至五环芳烃对该抗体的特异性进行鉴定, 结果表明 6A6 仅对茈和苯并茈具有高特异性, 对其余蒽, 菲以及萘的交叉反应率均小于 5%.

表 1 6A6 分泌单克隆抗体的性质表征¹⁾

Table 1 Characterization of monoclonal antibody 6A6

多环芳烃	结构	灵敏度/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	交叉反应率/%
苯并茈		6.8	119
茈		8.1	100
蒽		228.3	3.5
菲		446.0	1.8
萘		—	—

1) “—”代表为检测不到有效值

2.4 多环芳烃检测标准曲线

6A6 经 Protein A 免疫亲和柱纯化, AlexaFlour647

荧光化之后,根据文献方法[12]构建 KinExA 检测传感器. 选取不同浓度蒽和苯并蒽作为标准品,分别绘制 6A6 对蒽和苯并蒽检测的标准曲线(图 3). 从图 3 中可知,6A6 对蒽和苯并蒽的线性检测范围为 0.2 ~ 10.0 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. 而且,由于 6A6 对蒽和苯并蒽的识别灵敏度非常接近,因而可以在生物传感器中得到非常相似的两条标准曲线. 这就意味着,在实际的检测过程中,只需任选其中一种化合物作标准曲线,计算检测结果,而无需两种都做.

为了比较 6A6 在不同免疫检测方法中的检测效果,同时也测定了 6A6 在间接竞争 ELISA 体系中的标准曲线(图 4). 从图 4 中可以看出,蒽的检测标准曲线与苯并蒽的检测标准曲线同样非常相似,检测线性范围($\text{IC}_{20} \sim \text{IC}_{80}$)只是略有差异,分别为 2.5 ~ 30 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 2.7 ~ 24 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. 比较分析两种不同方法的检测范围,可以看出传感器方法更灵敏,可以达到更低的检测限(0.2 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$). 这也充分说明荧光化对单克隆抗体起到信号放大的作用. 但

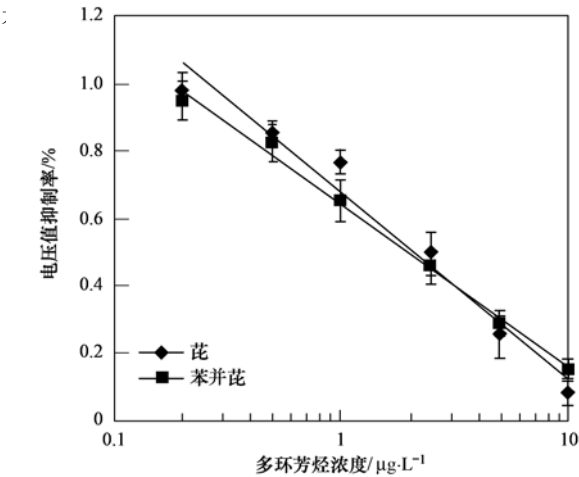


图 3 多环芳烃生物传感器法标准曲线
Fig. 3 Calibration curves of PAHs on sensor

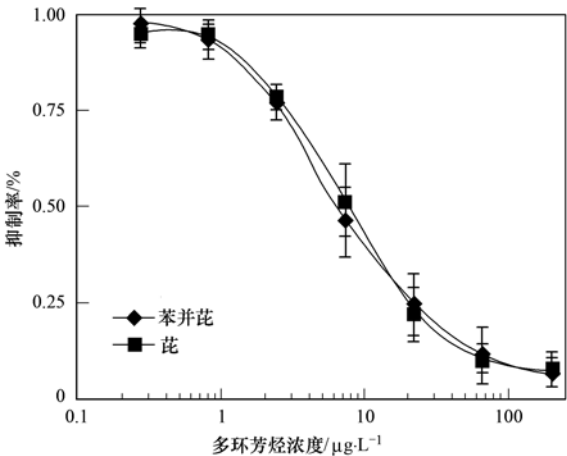


图 4 多环芳烃间接竞争 ELISA 标准曲线
Fig. 4 Calibration curves of PAHs on indirect competitive ELISA

在检测范围上,传感器的最大检测浓度只有 10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$,当样品含量大于该浓度时,需要先将样品进行稀释处理.

2.5 水样添加回收测定

取空白自来水,在其中分别加入苯并蒽或者蒽的标准溶液,配制成浓度分别为 5.0、2.0 和 0.5 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的加标样品,以单克隆抗体 6A6 为基础,分别使用传感器法与 ELISA 法测定加标样品中相应多环芳烃的含量,比较添加回收率,每个样品重复测定 3 次取平均值(表 2). 由表 2 可知,两种检测方法均具有很好的准确性,回收率均在正常波动范围之内. 当加标样品浓度为 5.0 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 2.0 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,两种检测方法回收率无明显差异,均在 95% ~ 110% 之间. 但是,当加标样品浓度为 0.5 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,由于已经超出了 ELISA 检测的线性范围,ELISA 法回收率明显降低,仅为 80% 左右. 因此,当测定低浓度蒽或者苯并蒽样品时,生物传感器法更具优势.

表 2 传感器法和 ELISA 法测定多环芳烃水样加标回收率¹⁾

Table 2 Recoveries of PAHs in spiked water samples by sensor and ELISA

多环芳烃	加标浓度/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	Sensor 回收率/%	Sensor 标准偏差/ $\pm \text{SD}$	ELISA 回收率/%	ELISA 标准偏差/ $\pm \text{SD}$
蒽	5.0	105.4	± 2.6	96.5	± 5.4
蒽	2.0	96.2	± 4.5	110.3	± 3.1
蒽	0.5	108.7	± 4.3	83.3	± 4.9
苯并蒽	5.0	98.8	± 6.7	103.5	± 2.3
苯并蒽	2.0	102.6	± 3.8	104.7	± 3.7
苯并蒽	0.5	95.3	± 2.1	81.6	± 4.1

1) 回收率均为 3 次测定的平均值

3 讨论

多环芳烃是一类普遍存在的环境污染物,如何

快速地检测多环芳烃也是研究热点之一. 以抗体为基础的免疫学检测方法,因其简单,快速,低成本,成为多环芳烃快速筛查的有力工具. 而在各种不同类

型的抗体之中,单克隆抗体因为性质稳定,灵敏度高,针对性强而更具优势.本研究利用芘丁酸作为半抗原,成功筛选到多环芳烃单克隆抗体 6A6,该抗体针对苯并芘的灵敏度对比同类多环芳烃多克隆抗体提高 10 倍左右^[25].为开发多环芳烃免疫检测方法提供了有力工具.

本研究通过对 6A6 的识别特异性进行比较分析,发现该单克隆抗体能特异性识别芘和苯并芘,而对其他 3 种二环至四环多环芳烃交叉反应率很低.造成该现象的原因可能与化学结构相关.从 5 种不同多环芳烃的结构式可以看到(表 1),苯并芘与芘具有非常相似的化学结构,与之相比,与蒽、菲、蔡的结构差异较大.考虑到本研究以芘丁酸作为半抗原,因此得到了对苯并芘与芘具有特异性的单克隆抗体.在今后的研究工作中,如需开发其他多环芳烃单克隆抗体,可以尝试免疫其他结构的多环芳烃衍生物作为半抗原.

本研究成功将单克隆抗体 6A6 应用于 KinExA 生物传感器,建立了苯并芘与芘的免疫快速检测新方法.通过与经典的酶联免疫分析(ELISA)法比较可知,传感器方法灵敏度更高,可以达到更低的检测限($0.2 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$).其原因是应用于传感器的抗体需要事先荧光化,该过程对抗体识别信号起到了放大的作用.通过加标回收实验的比较分析可知,在检测低含量的多环芳烃样品时,传感器法回收率更高,也就是说在检测低浓度样品时,传感器法准确性更高.另外,排除前期包被与封闭所需要的时间,ELISA 法检测一个样品需用时约 2 h,而传感器法分析每个样品的时间仅为 10 min,更加适合环境样品的快速筛查.

4 结论

本研究利用多环芳烃芘的衍生物芘丁酸作为半抗原,与牛血清白蛋白偶联制成人工免疫抗原,免疫小鼠进行单克隆抗体的研制,成功筛选得到单克隆抗体 6A6.该抗体能同时识别多环芳烃家族中的芘和苯并芘,并且具有很高灵敏度.以 6A6 为基础,构建用于芘和苯并芘检测的生物传感器新方法.通过比较分析可知,该方法无论在检测灵敏度或者检测时间方面,均较传统的 ELISA 方法具有优势.由添加回收实验可知,该方法准确度很高.因此,本研究研制了一种生物传感器,可以应用于环境样品中芘和苯并芘的快速初步筛选,具有很高应用价值.

参考文献:

- [1] Allan S E, Smith B W, Anderson K A. Impact of the deepwater horizon oil spill on bioavailable polycyclic aromatic hydrocarbons in Gulf of Mexico coastal waters[J]. *Environmental Science & Technology*, 2012, **46**(4): 2033-2039.
- [2] Kim K H, Jahan S A, Kabir E, *et al.* A review of airborne polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and their human health effects[J]. *Environment International*, 2013, **60**: 71-80.
- [3] 伯鑫,王刚,温柔,等. 焦炉排放多环芳烃与人体健康风险评估研究[J]. *环境科学*, 2014, **35**(7): 2742-2747.
- [4] 李佳乐,张彩香,王焰新,等. 太原市小店污灌区地下水中多环芳烃与有机氯农药污染特征及分布规律[J]. *环境科学*, 2015, (1): 172-178.
- [5] Poster D L, Schantz M M, Sander L C, *et al.* Analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in environmental samples: a critical review of gas chromatographic (GC) methods [J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2006, **386**(4): 859-881.
- [6] 蓝家程,孙玉川,师阳,等. 岩溶地下河流域表层土壤多环芳烃污染特征及来源分析[J]. *环境科学*, 2014, **35**(8): 2937-2943.
- [7] Lin Y Y, Liu G D, Wai C M, *et al.* Magnetic beads-based bioelectrochemical immunoassay of polycyclic aromatic hydrocarbons[J]. *Electrochemistry Communications*, 2007, **9**(7): 1547-1552.
- [8] Troisi G M, Borjesson L. Development of an immunoassay for the determination of polyaromatic hydrocarbons in plasma samples from oiled seabirds[J]. *Environmental Science & Technology*, 2005, **39**(10): 3748-3755.
- [9] Lin M H, Liu Y J, Sun Z H, *et al.* Electrochemical immunoassay of benzo[a]pyrene based on dual amplification strategy of electron-accelerated Fe_3O_4 /polyaniline platform and multi-enzyme-functionalized carbon sphere label[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2012, **722**: 100-106.
- [10] Matschulat D, Deng A P, Niessner R, *et al.* Development of a highly sensitive monoclonal antibody based ELISA for detection of benzo[a]pyrene in potable water[J]. *Analyst*, 2005, **130**(7): 1078-1086.
- [11] Pschenitz M, Hackenberg R, Niessner R, *et al.* Analysis of Benzo[a]pyrene in vegetable oils using Molecularly Imprinted Solid Phase Extraction (MISPE) coupled with Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) [J]. *Sensors*, 2014, **14**(6): 9720-9737.
- [12] Blake D A, Jones R M, Blake R C, *et al.* Antibody-based sensors for heavy metal ions[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2001, **16**(9-12): 799-809.
- [13] Chiu Y W, Li Q X, Karu A E. Selective binding of polychlorinated biphenyl congeners by a monoclonal antibody: analysis by kinetic exclusion fluorescence immunoassay [J]. *Analytical Chemistry*, 2001, **73**(22): 5477-5484.
- [14] Bu D, Zhuang H S, Zhou X C, *et al.* Biotin-streptavidin enzyme-linked immunosorbent assay for detecting

- Tetrabromobisphenol A in electronic waste[J]. *Talanta*, 2014, **120**: 40-46.
- [15] 刘淑娟, 赵晓祥, 程金平, 等. 快速检测软骨藻酸的间接 ELISA 方法[J]. *环境科学学报*, 2014, **34**(2): 404-408.
- [16] He X H, Patfield S, Hnasko R, *et al.* A polyclonal antibody based immunoassay detects seven subtypes of Shiga toxin 2 produced by *Escherichia coli* in human and environmental samples[J]. *PLoS One*, 2013, **8**(10): e76368.
- [17] Kuhne M, Dippong M, Flemig S, *et al.* Comparative characterization of mAb producing hapten-specific hybridoma cells by flow cytometric analysis and ELISA[J]. *Journal of Immunological Methods*, 2014, **413**: 45-56.
- [18] Peters J H, Baumgarten H. *Monoclonal Antibodies*[M]. Berlin: Springer Science & Business Media, 2012. 149-156.
- [19] Li P W, Zhang Q, Zhang W, *et al.* Development of a class-specific monoclonal antibody-based ELISA for aflatoxins in peanut[J]. *Food Chemistry*, 2009, **115**(1): 313-317.
- [20] Mishra N, Khatri K, Gupta M, *et al.* Development and characterization of LTA-appended chitosan nanoparticles for mucosal immunization against hepatitis B[J]. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 2014, **42**(4): 245-255.
- [21] Kolosova A Y, Shim W B, Yang Z Y, *et al.* Direct Competitive ELISA Based on a Monoclonal Antibody for Detection of Aflatoxin B1. Stabilization of ELISA Kit Components and Application to Grain Samples[J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2006, **384**(1): 286-294.
- [22] Yu H N, Jones R M, Blake D A. An immunosensor for autonomous in-line detection of heavy metals: validation for hexavalent uranium[J]. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 2005, **85**(12-13): 817-830.
- [23] McNamee S E, Elliott C T, Greer B, *et al.* Development of a planar waveguide microarray for the monitoring and early detection of five harmful algal toxins in water and cultures[J]. *Environmental Science & Technology*, 2014, **48**(22): 13340-13349.
- [24] Meng X Y, Li Y S, Zhou Y, *et al.* An enzyme-linked immunosorbent assay for detection of pyrene and related polycyclic aromatic hydrocarbons[J]. *Analytical Biochemistry*, 2015, **473**: 1-6.
- [25] Xu L, Zhao L, Cheng Y J, *et al.* Preparation of a new polyclonal antibody based on PAHs immunogen[J]. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 2014, **16**(3): 143-149.

CONTENTS

Composition and Source Apportionments of Saccharides in Atmospheric Particulate Matter in Beijing	LIANG Lin-lin, Guenter Engling, DUAN Feng-kui, <i>et al.</i> (3935)
Comparing Cell Toxicity of <i>Schizosaccharomyces pombe</i> Exposure to Airborne PM _{2.5} from Beijing and Inert Particle SiO ₂	LIU Meng-jiao, HUANG Yi, WEN Hang, <i>et al.</i> (3943)
Analysis on Regional Characteristics of Air Quality Index and Weather Situation in Beijing and Its Surrounding Cities During the APEC ...	GAO Qing-xian, LIU Jun-rong, WANG Ning, <i>et al.</i> (3952)
Analysis About Spatial and Temporal Distribution of SO ₂ and An Ambient SO ₂ Pollution Process in Beijing During 2000-2014	CHENG Nian-liang, ZHANG Da-wei, LI Yun-ting, <i>et al.</i> (3961)
Characteristics and Formation Mechanism of a Multi-Day Haze in the Winter of Shijiazhuang Using a Single Particle Aerosol Mass Spectrometer (SPAMS)	 ZHOU Jing-bo, REN Yi-bin, HONG Gang, <i>et al.</i> (3972)
Modeling Study of A Typical Summer Ozone Pollution Event over Yangtze River Delta	ZHANG Liang, ZHU Bin, GAO Jin-hui, <i>et al.</i> (3981)
Distribution of Regional Pollution and the Characteristics of Vertical Wind Field in the Pearl River Delta	LIU Jian, WU Dui, FAN Shao-jia (3989)
Distribution Characteristics of Urea and Constitution of Dissolved Nitrogen in the Bohai Sea and the Huanghai Sea in Spring	LI Zhi-lin, SHI Xiao-yong, ZHANG Chuang-song (3999)
Relationship Between Agricultural Land and Water Quality of Inflow River in Erhai Lake Basin	PANG Yan, XIANG Song, CHU Zhao-sheng, <i>et al.</i> (4005)
Input Characteristics and Pollution Assessment of Nutrients Pollution in the Primary Pollution Source of the Daliao River	MA Ying-qun, ZHANG Lei, ZHAO Yan-min, <i>et al.</i> (4013)
Temporal and Spatial Distribution of Nutrients in Daning River Sediments and Their Correlations with Chlorophyll in the Three Gorges Reservoir Area	 ZHANG Yong-sheng, LI Hai-ying, REN Jia-ying, <i>et al.</i> (4021)
Summer Greenhouse Gases Exchange Flux across Water-air Interface in Three Water Reservoirs Located in Different Geologic Setting in Guangxi, China	 LI Jian-hong, PU Jun-bing, SUN Ping-an, <i>et al.</i> (4032)
Distribution of Redox Zone at Different Water Layers in the Presence of Periphyton and the Responsible Microorganisms	WANG Feng-wu, LIU Wei, WAN Juan-juan, <i>et al.</i> (4043)
Distribution Characteristics and Source of Fluoride in Groundwater in Lower Plain Area of North China Plain: A Case Study in Nanpi County	 KONG Xiao-le, WANG Shi-qin, ZHAO Huan, <i>et al.</i> (4051)
Distribution Characteristics of Fluoroquinolones Antibiotics in Surface Water and Groundwater from Typical Areas in A City	CUI Ya-feng, HE Jiang-tao, SU Shi-hui, <i>et al.</i> (4060)
Distribution of Aerobic Ammonia-Oxidizing Microorganisms in Sediments from Adjacent Waters of Rushan Bay	HE Hui, ZHEN Yu, MI Tie-zhu, <i>et al.</i> (4068)
Sources, Migration and Conversion of Dissolved Sterols in Qingmuguan Underground River	LIANG Zuo-bing, SHEN Li-cheng, SUN Yu-chuan, <i>et al.</i> (4074)
Water-Sediment Partition of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Karst Underground River	LAN Jia-cheng, SUN Yu-chuan, XIAO Shi-zhen (4081)
Variation Characteristics and Sources of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Karst Subterranean River During Rainfall Events	JIANG Ze-li, SUN Yu-chuan, WANG Zun-bo, <i>et al.</i> (4088)
Distribution and Transportation Characteristics of Heavy Metals in Nanshan Laolongdong Subterranean River System and Its Capacity of Self-Purification in Chongqing	 REN Kun, LIANG Zuo-bing, YU Zheng-liang, <i>et al.</i> (4095)
Distribution of Mercury in Plants at Water-Level-Fluctuating Zone in the Three Gorges Reservoir	LIANG Li, WANG Yong-min, LI Xian-yuan, <i>et al.</i> (4103)
Development of Sediment Micro-Interface Under Physical and <i>Chironomus plumosus</i> Combination Disturbance	WANG Ren, LI Da-peng, HUANG Yong, <i>et al.</i> (4112)
Norfloxacin Solution Degradation Under Ultrasound, Potassium Persulfate Collaborative System	WEI Hong, SHI Jing-zhuan, LI Jia-lin, <i>et al.</i> (4121)
Degradation of Acid Orange 7 with Persulfate Activated by Silver Loaded Granular Activated Carbon	WANG Zhong-ming, HUANG Tian-yin, CHEN Jia-bin, <i>et al.</i> (4127)
Kinetics and Reactive Species Analysis of Dimetridazole Degradation by TiO ₂	CHEN Dong-mei, YU Ze-bin, SUN Lei, <i>et al.</i> (4135)
Performance and Mechanism of Ferric Tannate in the Removal of Inorganic Nitrogen from Wastewater	ZHANG Rui-na, LI Lin, LIU Jun-xin (4141)
Performance of an Intermittent Aeration Membrane Bioreactor for Removal of Veterinary Antibiotics from Piggery Wastewater	DING Jia-li, LIU Rui, ZHENG Wei, <i>et al.</i> (4148)
Advanced Treatment of Incineration Leachate with O ₃ -BAC and Double O ₃ -BAC	DU An-jing, FAN Ju-hong, LIU Rui, <i>et al.</i> (4154)
Effects of Hydraulic Retention Time and Dissolved Oxygen on a CANON Reactor with Haydite as Carrier	WANG Hui-fang, FU Kun-ming, ZUO Zao-rong, <i>et al.</i> (4161)
Inhibiting Form of Ammonium to AOB and Inhibiting Rule	CUI Jian-hong, LI Xiang, HUANG Yong, <i>et al.</i> (4168)
Nitrogen Removal Using ANAMMOX and Denitrification for Treatment of Municipal Sewage	ZHANG Shi-ying, WU Peng, SONG Yin-ling, <i>et al.</i> (4174)
Rapid Start-up of Simultaneous Nitrification and Denitrification Coupled Phosphorus Removal Process and Its Performing Characteristics	LENG Lu, XIN Xin, LU Hang, <i>et al.</i> (4180)
Effect of HCO ₃ ⁻ on Nitrogen Removal Efficiency in Partial Nitritation-ANAMMOX Process	LI Xiang, CHENG Zong-heng, HUANG Yong, <i>et al.</i> (4189)
Research on Cultivation and Stability of Nitritation Granular Sludge in Integrated ABR-CSTR Reactor	WU Kai-cheng, WU Peng, SHEN Yao-liang, <i>et al.</i> (4195)
Influence of the Application of Activated Persulfate on Municipal Sludge Conditioning	XU Xin, PU Wen-hong, SHI Ya-fei, <i>et al.</i> (4202)
Influence of Temperature on the Anaerobic Packed Bed Reactor Performance and Methanogenic Community	XIE Hai-ying, WANG Xin, LI Mu-yuan, <i>et al.</i> (4208)
Research on the Screening Method of Soil Remediation Technology at Contaminated Sites and Its Application	BAI Li-ping, LUO Yun, LIU Li, <i>et al.</i> (4218)
Comprehensive Risk Assessment of Soil Heavy Metals Based on Monte Carlo Simulation and Case Study	YANG Yang, DAI Dan, CAI Yi-min, <i>et al.</i> (4225)
Heavy Metals Pollution in Topsoil from Dagang Industry Area and Its Ecological Risk Assessment	ZHANG Qian, CHEN Zong-juan, PENG Chang-sheng, <i>et al.</i> (4232)
Effects of Land Use Type on Soil Microbial Biomass Carbon and Nitrogen in Water-Stable Aggregates in Jinyun Mountain	LI Zeng-quan, JIANG Chang-sheng, HAO Qing-ju (4241)
Influence of Different Straws Returning with Landfill on Soil Microbial Community Structure Under Dry and Water Farming	LAN Mu-ling, GAO Ming (4252)
Carbon Source Utilization Characteristics of Soil Microbial Community for Apple Orchard with Interplanting Herbage	DU Yi-fei, FANG Kai-kai, WANG Zhi-kang, <i>et al.</i> (4260)
Effects of Different Kinds of Organic Materials on Soil Heavy Metal Phytoremediation Efficiency by <i>Sedum alfredii</i> Hance	YAO Gui-hua, XU Hai-zhou, ZHU Lin-gang, <i>et al.</i> (4268)
<i>In-situ</i> Study on Effects of Combined Amendment on Translocation Control of Pb and Cd in Soil-Vegetable System	ZHU Wei, LIU Li, WU Yan-ming, <i>et al.</i> (4277)
Effects of Rice Cultivar and Typical Soil Improvement Measures on the Uptake of Cd in Rice Grains	WANG Mei-e, PENG Chi, CHEN Wei-ping (4283)
Pollution Characteristics and Ecological Risk Assessment of PAHs in Water and Fishes from Daqing Lakes	WANG Xiao-di, ZANG Shu-ying, ZHANG Yu-hong, <i>et al.</i> (4291)
Depth Profiles of Methane Oxidation Kinetics and the Related Methanotrophic Community in a Simulated Landfill Cover	XING Zhi-lin, ZHAO Tian-tao, GAO Yan-hui, <i>et al.</i> (4302)
Enhanced Performance of Rolled Membrane Electrode Assembly by Adding Cation Exchange Resin to Anode in Microbial Fuel Cells	MEI Zhuo, ZHANG Zhe, WANG Xin (4311)
Development of a Monoclonal Antibody-Based Sensor for Environmental Pyrene and Benzo(a)pyrene Detection	LI Xin, QIAO Yan, ZHONG Guo-zhen (4319)

《环境科学》第6届编辑委员会

主 编: 欧阳自远

副主编: 赵景柱 郝吉明 田 刚

编 委: (按姓氏笔画排序)

万国江 王华聪 王凯军 王绪绪 田 刚 田 静 史培军
朱永官 刘志培 刘 毅 汤鸿霄 孟 伟 周宗灿 林金明
欧阳自远 赵景柱 姜 林 郝郑平 郝吉明 聂永丰 黄 霞
黄 耀 鲍 强 潘 纲 潘 涛 魏复盛

环 境 科 学

(HUANJING KEXUE)

(月刊 1976年8月创刊)

2015年11月15日 第36卷 第11期

ENVIRONMENTAL SCIENCE

(Monthly Started in 1976)

Vol. 36 No. 11 Nov. 15, 2015

主 管	中国科学院	Superintended	by	Chinese Academy of Sciences
主 办	中国科学院生态环境研究中心	Sponsored	by	Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences
协 办	(以参加先后为序) 北京市环境保护科学研究院 清华大学环境学院	Co-Sponsored	by	Beijing Municipal Research Institute of Environmental Protection School of Environment, Tsinghua University
主 编	欧阳自远	Editor-in -Chief		OUYANG Zi-yuan
编 辑	《环境科学》编辑委员会 北京市2871信箱(海淀区双清路 18号, 邮政编码:100085) 电话:010-62941102, 010-62849343 传真:010-62849343 E-mail: hjkx@ rcees. ac. cn http://www. hjkx. ac. cn	Edited	by	The Editorial Board of Environmental Science (HUANJING KEXUE) P. O. Box 2871, Beijing 100085, China Tel:010-62941102, 010-62849343; Fax:010-62849343 E-mail: hjkx@ rcees. ac. cn http://www. hjkx. ac. cn
出 版	科学出版社 北京东黄城根北街16号 邮政编码:100717	Published	by	Science Press 16 Donghuangchenggen North Street, Beijing 100717, China
印刷装订	北京北林印刷厂	Printed	by	Beijing Bei Lin Printing House
发 行	科学出版社 电话:010-64017032 E-mail: journal@ mail. sciencep. com	Distributed	by	Science Press Tel:010-64017032 E-mail: journal@ mail. sciencep. com
订 购 处	全国各地邮电局	Domestic		All Local Post Offices in China
国外总发行	中国国际图书贸易总公司 (北京399信箱)	Foreign		China International Book Trading Corporation (Guoji Shudian), P. O. Box 399, Beijing 100044, China

中国标准刊号: ISSN 0250-3301
CN 11-1895/X

国内邮发代号: 2-821

国内定价: 120.00元

国外发行代号: M 205

国内外公开发行