

快速检测生鲜乳中玉米赤霉醇试纸条的研制及其应用

吴昌林¹, 刘彬², 谢本华³, 毕思远^{4,5*}, 朱海³, 李晓娜⁵

(1. 南京卫岗乳业有限公司, 江苏南京 211106; 2. 重庆天友乳业股份有限公司, 重庆 401120; 3. 深圳市易瑞生物技术股份有限公司, 广东深圳 518101; 4. 哈尔滨体育学院, 黑龙江哈尔滨 150008; 5. 深圳市通量检测技术有限公司, 广东深圳 518102)

摘要 [目的]采用免疫胶体金技术,建立了一种快速检测玉米赤霉醇的试纸条方法。[方法]利用有机合成方法,研制了一种玉米赤霉醇半抗原,将其载体蛋白偶联得到免疫抗原,并通过人工免疫的方法获得单克隆抗体。通过酶联免疫法对制备的单克隆抗体的性能进行了验证。玉米赤霉醇层析试纸条是利用单克隆抗体标记胶体金,其原理是玉米赤霉醇抗原和羊抗鼠 IgG 分别喷到自制的膜(硝酸纤维)上,然后将样品垫、吸水垫分别放置在 PVC 板上,再制成试纸条。[结果]试纸条检测限可达 0.5~1.0 μg/kg,具有速度快、简单等优点。此外,该试纸条与大部分的玉米赤霉醇没有明显的交叉反应。[结论]利用该试纸条可实现对生鲜乳中玉米赤霉醇添加试验的准确判定。该试纸条有望实现对生鲜乳中玉米赤霉醇残留的快速筛查。

关键词 生鲜乳;玉米赤霉醇;试纸条;单克隆抗体;免疫层析;胶体金

中图分类号 TS207 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2018)15-0151-04

Research and Application of Dipstick Detecting Zeranol in Raw Milk

WU Chang-lin¹, LIU Bin², XIE Ben-hua³ et al (1. Nanjing Weigang Dairy Co. Ltd., Nanjing, Jiangsu 211106; 2. Chongqing Tianyou Dairy Co., Ltd., Chongqing 401120; 3. Shenzhen Bioeasy Technology Co., Ltd., Shenzhen, Guangdong 518101)

Abstract [Objective] This research aimed to establish a rapid strip detection method for zeranol by immune gold colloid technology. [Method] The hapten of zeranol was prepared via a synthetic organic method, and was conjugated with the carrier protein to obtain the antigen. Monoclonal antibody was obtained with the artificial immune method and its affinity was verified with the enzyme immunoassay. The colloid gold immunochromatographic strip was prepared with monoclonal antibody conjugated gold colloid which was stored in microwells, and a PVC liner which was assembled with nitrocellulose membrane sprayed with zeranol antigen and goat anti-mouse IgG, sample pad and absorbent pad. [Result] The strip had a detection limit in the range of 0.5 - 1.0 μg/kg with the advantages of fastness, easiness, etc. In addition, the strip did not cross-react with most of the pyrethroid pesticides tested. [Conclusion] With the strip, the accurate determination of the addition of zearalan in raw milk is achieved. This strip is expected to achieve fast screening of zearalanol residues in raw milk.

Key words Raw milk; Zeranol; Strip; Monoclonal antibody; Immune-chromatography; Colloidal gold

玉米赤霉菌在生长过程中会产生次级代谢产物玉米赤霉醇(zeranol),玉米赤霉醇亦是玉米赤霉烯酮的还原产物,具有类似雌激素活性^[1]。玉米赤霉醇对动物脑下垂体和胰脏产生作用,影响生物体内甲状腺素水平及生殖系统的生长发育,促进机体蛋白质的合成。它曾作为动物尤其是牛羊的生长促进剂,促进动物对饲料的利用率并提高其增重率,以提高经济效益。然而,畜禽摄取含有玉米赤霉醇的食物后,在其组织及体液中(乳汁)会有一些残留。这些残留会引起人体性激素水平失调从而影响人类健康。当机体摄取的玉米赤霉醇超过一定量时,可能会影响第二性征的正常发育甚至癌变^[2-3]。1998 年欧盟禁止将玉米赤霉醇等激素类药物用于畜禽饲养。我国卫生部于 2010 年明确禁止将玉米赤霉醇等激素类药物用于畜禽生长促进剂。为保证食品安全,对动物源性食物及其制品中玉米赤霉醇的检测非常重要。

传统测定玉米赤霉烯醇的方法主要基于色谱分离和酶联免疫法,主要有薄层色谱^[1]、高效液相色谱(HPLC)^[4-5]、高效液相色谱质谱联用(HPLC-MS)^[6-7]和酶联免疫(ELISA)方法等^[8-9]。传统方法检测首先要采用有机溶剂对样品中目标物进行提取,然后利用萃取或免疫亲和柱等前处

理方法进行样品前处理,以去除杂质。与大型仪器检测相比,酶联免疫分析方法检测成本低,可同时实现对多个样品检测。但是,酶联免疫法不仅需要具备专业知识的人员操作,而且试验结果易受外界因素干扰而产生较大影响,如提取溶液的离子强度、孵育温度等,另外不同样品基质对结果影响也很大。与 ELISA 方法相比,胶体金免疫层析方法是一种更简便、快速的检测方法^[10-12],其具有前处理方便、检测效率高、能通过肉眼直接判断结果等优点。笔者依据胶体金层析原理,即抗原、抗体之间的竞争反应,开发出了一种生鲜乳中玉米赤霉醇残留的检测方法。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂 LC-MSQDESI 液质联用仪(AB4000+); IKA RV10 V 型旋转蒸发仪(广州艾卡);电动加热搅拌机 IKA basic(广州艾卡);氯金酸;玉米赤霉醇等标准品;溴乙酸叔丁酯;牛血清蛋白(BSA);1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二胺盐酸盐(EDC,安耐吉公司);弗氏完全佐剂与弗氏不完全佐剂(美国 Sigma 公司);吡啶、N,N-二甲基甲酰胺(DMF)、三氯甲烷、二氯甲烷、三氟乙酸等有机试剂,国药集团化学试剂有限公司。

1.2 玉米赤霉醇半抗原、抗原的合成 半抗原的合成流程见图 1。准确称取 0.16 g 的玉米赤霉醇,加入碳酸钾 0.5 g、DMF 10 mL,50℃反应 10 min 后滴加溴乙酸叔丁酯 0.2 g,加毕后 80℃反应 12 h,反应结束后将溶剂旋转蒸干,加水,用乙酸乙酯萃取,有机相用无水硫酸钠干燥处理后蒸干;在冰浴下,将溶有的中间产物用 10 mL 二氯甲烷溶解,缓慢滴加

基金项目 中国博士后科学基金项目(2017M611382);深圳市技术攻关项目(JSGG20160429184803117);广东省省级科技计划项目(2015A090905020,2015A040404018)。

作者简介 吴昌林(1980—),男,江苏南京人,工程师,从事食品安全检测分析与实验室管理工作。*通讯作者,副研究员,博士,从事食品安全快速检测研究及法医毒物分析工作。

收稿日期 2018-02-06;修回日期 2018-03-12

5 mL 三氟乙酸 5 mL, 反应 2 h, 将溶剂蒸干, 再次加水, 用乙酸乙酯萃取, 蒸干溶剂得到玉米赤霉醇半抗原。

称取玉米赤霉醇半抗原 15 mg, 溶于 2 mL DMF 加入 36 mg N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS)、34 mg EDC-HCl; 将

32 mg BSA 溶于体积为 3.2 mL 的 0.1 mol/L 硼酸缓冲液 (pH 9.0), 加入 1 mL DMF, 0.5 mL 上述溶液室温反应过夜, 对 PBS 透析 2~3 d, 离心, 分装, 冻存。

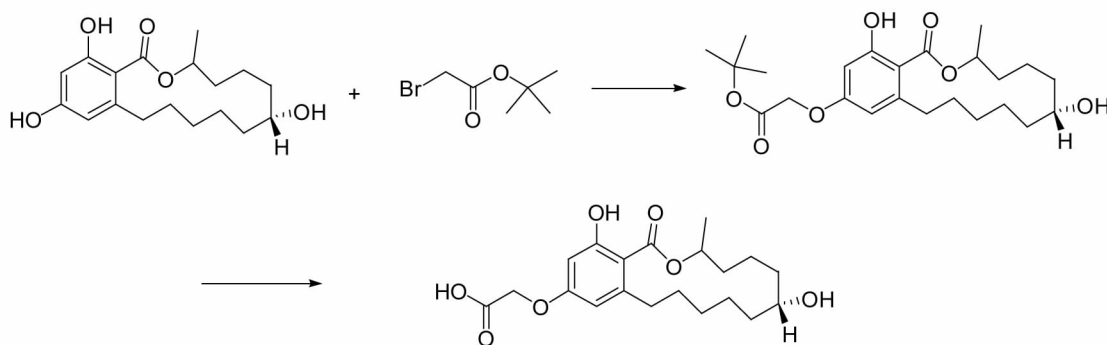


图 1 玉米赤霉醇半抗原的合成流程

Fig.1 Synthesis routing of zeraanol hapten

1.3 单克隆抗体的制备及酶联免疫 (ELISA) 表征 按照人工抗原免疫的方法, 对健康的雌性 BALB/c 小鼠进行免疫 42~56 d。具体流程如下: 第 1 次免疫采用弗氏完全佐剂乳化 50 μ g 人工抗原, 第 2 次、第 3 次、第 4 次免疫时采用不完全佐剂乳化, 每次处理时间间隔为 14 d。等到最后一次免疫 3 d 之后, 在无菌室内将小鼠脾细胞取出, 再将其与骨髓瘤细胞 SP2/0 (比例为 5:1) 用聚乙二醇 (PEG) 介导方法进行融合。将融合的细胞培养后, 利用间接竞争 ELISA 法选择单克隆抗体细胞株, 再利用获得的细胞诱导小鼠产生腹水, 最后再加入饱和硫酸铵溶液, 沉淀并纯化制得抗玉米赤霉醇的单克隆抗体。将纯化后的单克隆抗体包被在酶联免疫板上, 利用 ELISA 方法测定单克隆抗体的性能。

1.4 胶体金的制备方法 按照柠檬酸三钠法分别制备胶体金 (直径约为 40 nm)。制备过程: 将烧瓶、球形冷凝管、加热套、冷凝水搭建一个回流装置, 将 50.0 mL 质量分数为 0.01% 的氯金酸溶液置于烧瓶中加热至沸腾, 再迅速加入质量分数为 1% 的柠檬酸三钠溶液 0.50 mL, 待反应完全且溶液颜色保持稳定, 继续加热回流 10 min, 冷却, 冷藏备用。

1.5 胶体金标记抗体 胶体金标记抗体制备金标抗体探针的方法参考文献 [9] 进行, 即取适量熬制好的胶体金溶液至 250 mL 烧杯中, 用 0.1 mol/L K_2CO_3 溶液调节胶体金溶液 pH, 用一级水溶解抗体至胶体金 1/10 体积, 逐滴加入已熬制好胶体金溶液, 不断搅拌反应 0.5 h, 抗体标记浓度分别为 0.5、1.0、2.0 μ g/mL, 然后按胶体金 1/10 的体积逐滴加入浓度为 10% 的 BSA, 继续搅拌封闭 0.5 h, 再继续按胶体金 1/10 体积逐滴加入 1% 聚乙二醇 (PEG 20000), 搅拌封闭 0.5 h 后, 在 9 000 r/min 转速下高速离心 0.5 h, 用吸管吸去上清后, 并加入原体积 1/10 的复溶液 (含有 1% BSA、2% 蔗糖、0.05% PEG 20000、0.1% NaN_3 的 pH 为 7.4 的 0.02 mol/L 的磷酸盐缓冲液) 重悬金标抗体。

1.6 玉米赤霉醇胶体金试纸条的制备方法 将玉米赤霉醇抗原用 PBS 溶液稀释成浓度为 1.5 mg/mL 的溶液, 再将羊抗

鼠 IgG 用 PBS 稀释成 1 mg/mL 的溶液。用喷膜机将上述 2 种溶液以 1.0 μ L/cm 的速度喷于硝酸纤维膜上, 分别形成控制线 (C) 和检测线 (T) 2 条线, 然后将喷制好的硝酸纤维膜置于 37 $^{\circ}C$ 培养箱中干燥 4 h。最后将硝酸纤维素膜、吸水垫、样品垫按顺序粘贴在 PVC 衬板上, 将其切割成 4 mm 等宽的试纸条, 即可。

1.7 试纸条检出限试验 用阴性生鲜乳为基质, 分别将阴性基质、含玉米赤霉醇竞争物质浓度为 0.3、0.5、0.7、1.0、2.0 ng/mL 的加标基质, 点样于 1、2、3、4、5、6 号同一批次试纸条, 比较结果: T 线和 C 线皆显色确定为阴性, T 线不显色或显色明显变淡而 C 线显色则为阳性, C 线不显色则确定无效。分别检测 3 批次样品, 每批次重复 10 次, 取平均值作为最终结果。

1.8 试纸条特异性试验 选择与玉米赤霉醇结构相近的类似物, 如 α -玉米赤霉醇、 β -玉米赤霉醇、 α -玉米赤霉烯醇、 β -玉米赤霉烯醇、玉米赤霉酮和玉米赤霉烯酮, 用生鲜乳位基质将其分别稀释至 0.5、1.0、2.0 ng/mL 备用, 用不含玉米赤霉醇阴性基质作为对照组, 分别点样于同一批制备的试纸条, 观察结果。分别检测 3 批次样品, 每批次重复 10 次, 取平均值作为最终结果。

1.9 试纸条稳定性试验 取制备的同一批次试纸条, 检查其活性, 时间间隔为 30 d; 当时间间隔达到 1 个月后, 随机抽取试纸条进行 3 批样品检测, 每批次重复 10 次, 取平均值作为检测结果, 考察其稳定性。

1.10 试纸条重复性试验 对同一批次的试纸条分别进行 3 个批次样品的检测, 每批次重复检测 10 次; 取同一样品, 分别用 3 个不同批次的试纸条检测, 每批次重复检测 10 次, 取平均值作为最终结果。

1.11 试纸条实际样品加标与干扰试验 对 8 个不同来源的牧场鲜奶, 选取其中 2 个分别加入 200 μ g/kg 三聚氰胺、4 μ g/kg 青霉素 G 抗生素, 与其他 6 个牧场鲜奶一起共 8 组样品, 经仪器方法定量不含玉米赤霉醇后, 分别对空白对照

组的 8 组样品各重复 20 次检测,以及各添加 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 玉米赤霉醇加标物后,对 8 组加标样品各重复 20 次检测,看实际样品加标结果与存在干扰物质的实际样品检测结果情况。

2 结果与分析

2.1 半抗原的合成 玉米赤霉醇的合成路线如图 1 所示,与溴乙酸叔丁酯反应得到叔丁酯化物中间体,该中间体通过三氟乙酸反应获得脱除叔丁基的目标物。使用溴代某酸叔丁酯为连接手臂的好处是在最后的脱酯过程中不使用强碱,保证了玉米赤霉醇分子内的酯键不发生水解活性受到破坏。

2.2 ELISA 检测单克隆抗体的灵敏度 为了验证纯化后玉米赤霉醇抗体的灵敏度情况,利用 ELISA 法进行验证试验。绘制玉米赤霉醇 ELISA 标准曲线如图 2,从图中可以看出,玉米赤霉醇抗体对玉米赤霉醇在 0.1 ~ 10.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 具有较好的线性关系,从而证明了该方法制备的单克隆抗体对玉米赤霉醇具有高选择性和灵敏性,所以利用该单克隆抗体制备的快速检测试纸条可以对含有玉米赤霉醇的样品进行快速、高灵

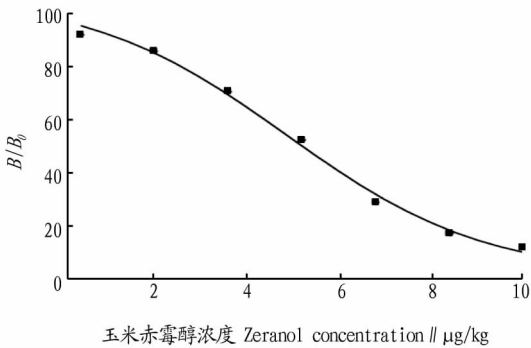


图 2 玉米赤霉醇 ELISA 标准曲线
Fig. 2 ELISA standard curve of zeranone

敏检测。

2.3 胶体金标记玉米赤霉醇单克隆抗体 按该试验方法制备的胶体金颜色为酒红色,直径约为 40 nm,最大吸收波长约为 528 nm。通过 Mey 氏稳定性试验,确定最佳标记量和最佳标记 pH,获得标记的最优条件为 pH 8.5 Tris 缓冲溶液 (0.1 mol/L),抗体与胶体金的最佳比例为 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。试验证明,在此条件下胶体金联苯菊酯单克隆抗体复合物最稳定,未出现团聚等现象。因而,利用 pH 为 8.5 Tris 缓冲溶液 (0.1 mol/L),比例为抗体与胶体金 (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 进行标记。

2.4 玉米赤霉醇试纸条的最小检测限 试纸条检出限试验中,每批次的试纸条结果中 3 ~ 6 号试纸条均能稳定得出 T 线颜色变弱于 C 线,或明显弱于 C 线颜色,甚至 T 线消失而 C 线颜色开始逐渐变强,即在 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 浓度点开始检出阳性结果。

分别选择含有不同浓度的玉米赤霉醇样品 (0、0.5、1.0、2.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$),利用制备的玉米赤霉醇试纸条检测,重复 5 次检测的结果如图 3。试验证明,当样品中含有玉米赤霉醇的浓度逐渐变高时,试纸条中 T 线的颜色逐渐减弱,而 C 线的颜色逐渐加强,与预期结果一致。当玉米赤霉醇的浓度为 0 时,T 线颜色明显强于 C 线颜色,结果判定为阴性;当玉米赤霉醇的浓度为 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 时,T 线强度与 C 线颜色相当,结果判定为弱阳性;当玉米赤霉醇的浓度为 1.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 时,T 线颜色比 C 线颜色弱,结果判定为阳性;当玉米赤霉醇的浓度为 2.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 时,T 线几乎不显示,结果判定为强阳性。表明该试验制得的试纸条对玉米赤霉醇的检测浓度为 0.5 ~ 1.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$,检测结果重复性好。

2.5 交叉反应 从试纸条分别对 6 种浓度为 4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 玉米赤霉醇类似物重复测试 5 次的结果 (表 1) 可以看出,试纸条

T线 C线

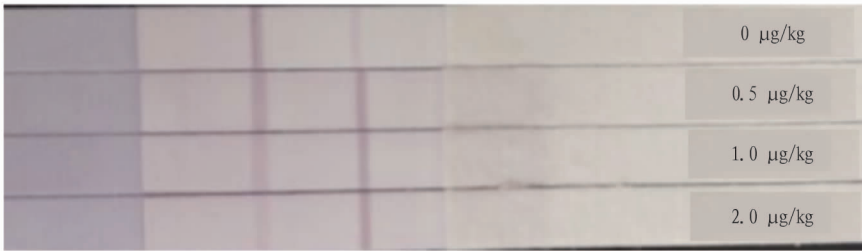


图 3 玉米赤霉醇检测限结果
Fig. 3 Detection limit results for zeranone

表 1 交叉反应试验结果
Table 1 Cross-reaction results

类似物名称 Analogue name	阴性结果次数 Negative No.	阳性结果次数 Positive No.
α -玉米赤霉醇 α -zeranol	5	0
β -玉米赤霉醇 β -zeranol	5	0
α -玉米赤霉烯醇 α -zearelenol	5	0
β -玉米赤霉烯醇 β -zearelenol	5	0
玉米赤霉酮 Zearalanone	5	0
玉米赤霉烯酮 Zearalenone	5	0

对 6 种类似物重复 5 次试验的结果均为阴性,表明试纸条对

6 种不同的结构类似物 (4 $\mu\text{g}/\text{kg}$) 是没有交叉反应。虽然这 6 种物质的结构与玉米赤霉醇十分相似,但试纸条均能准确辨别,进一步证明了该试纸条具有良好的特异性。

2.6 试纸条稳定性和重复性试验 试纸条稳定性试验中,取 3 批试纸条每隔 1 个月重复检测配标浓度为 1.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的样品,10 次重复的结果均显色一致,且 T 线均明显浅于 C 线,结果稳定。试纸条重复性试验中,取 3 批试纸条,针对 3 组不同样品进行 10 次重复试验,结果显示,空白组的 3 批试纸条共 30 次检测结果均为阴性;而 2 组对照加标组,3 批试纸条各重复 10 次的结果,共 60 次检测结果均为阳性,且显

色结果一致,重复性好。

2.7 实际样品的加标与干扰试验 分别取 8 组不同牧场的新鲜生鲜乳各 200 μL 加入微孔中,再加入玉米赤霉醇标准品混匀后,用试纸条对样品重复检测 20 次。结果表明(表 2),没有加入玉米赤霉醇的对照组中,各牧场 20 次的检测结果均为阴性,当加入标液浓度为 1.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的玉米赤霉醇时,20 次检测的结果均为阳性。可见,按照该试验制备的试纸条对浓度为 1.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的玉米赤霉醇检测准确,结果稳定性和重现性均较好,当有三聚氰胺与青霉素 G 抗生素干扰物存在时,检测结果也不受干扰。

表 2 加标试验结果

Table 2 Detection results of standard addition of zearanol

类别 Type	阳性结果次数 Positive No.	阴性结果次数 Negative No.
对照组 Control	0	160
加标组(最终浓度 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$) Sample (Final Concentration: 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$)	160	0

3 结论

该研究利用有机合成的方法首先制备玉米赤霉醇半抗原,然后利用人工免疫小鼠制备单克隆抗体,该抗体对玉米赤霉醇具有特异性识别能力,再将所制备的单克隆抗体标记到胶体金表面,分装至微孔反应杯冻干。最后将玉米赤霉醇抗原与羊抗鼠二抗喷制在硝酸纤维素膜上,再将硝酸纤维素膜、样品垫和吸水垫依次粘附在 PVC 地板上,制备出玉米赤霉醇快速检测试纸条。该试纸条的检测限可达 0.5 ~ 1.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$,符合欧盟及国家标准规定的限量范围。试验证明,该方法具有检测快速、前处理过程操作方便的优点,经新鲜生鲜乳样品检测验证,该方法能够满足鲜乳中残留玉米赤霉醇现场快速筛查的要求,可在乳品企业中推广应用。

(上接第 144 页)

部轻、东部和北部重的空间分布。

(2)干热风的形成原因方面来看,受气流影响该区天气晴朗、温度较高、空气相对干燥都有助于干热风气候的出现;另外,选择晚熟品种、氮肥施用过量、灌水量少或过晚等人为因素也可能导致干热风的发生。

参考文献

- [1] 郝慧芳.河南小麦生产农业气象灾害风险分析及区划[J].北京农业,2015(12):185.
- [2] 朱伟,李玉兰,闫世忠,等.豫东地区小麦主要的气象灾害及综合防御技术[J].农业科技通讯,2009(12):117-118.
- [3] 成林,张志红,常军.近 47 年来河南省冬小麦干热风灾害的变化分析

参考文献

- [1] WANG S,WANG X H. Analytical methods for the determination of zearanol residues in animal products:A review [J]. Food additives & contaminants, 2007,24(6):573-582.
- [2] FRIZZELL C, NDOSSI D, VERHAEGEN S, et al. Endocrine disrupting effects of zearalenone, alpha-and beta-zearalenol at the level of nuclear receptor binding and steroidogenesis [J]. Toxicology letters, 2011,206(2):210-217.
- [3] TAKEMURA H, SHIM J Y, SAYAMA K, et al. Characterization of the estrogenic activities of zearalenone and zearanol *in vivo* and *in vitro* [J]. J Steroid Biochem & Mol Biol, 2007,103(2):170-177.
- [4] IRAKLI M N, SKENDI A, PAPAGEORGIOU M D. HPLC-DAD-FLD method for simultaneous determination of mycotoxins in wheat bran [J]. J Chromatogr Sci, 2017,55(7):690-696.
- [5] YOU L N, LI X L, XI C X, et al. Simultaneous determination of residues of six zearanols in eggs by high performance liquid chromatography with immunoaffinity cleanup column [J]. Chinese journal of chromatography, 2012,30(10):1021-1025.
- [6] ANDRADE P D, DANTAS R R, DA SILVA DE MOURA-ALVES T L, et al. Determination of multi-mycotoxins in cereals and of total fumonisins in maize products using isotope labeled internal standard and liquid chromatography/tandem mass spectrometry with positive ionization [J]. J Chromatogr A, 2017,1490:138-147.
- [7] ECHARTE J M, FERNÁNDEZ D C, CHIACCHIO C A, et al. Comparison of a validated LC/MS/MS method with a validated GC/MS method for the analysis of zearanol and its related mycotoxin residues in bovine urine samples collected during argentina's residue monitoring control program(2005-2012) [J]. J AOAC Int, 2014,97(5):1470-1475.
- [8] 刘媛,刘贤进,余向阳,等.玉米赤霉醇人工抗原合成及其多克隆抗体的制备[J].分析科学学报,2006,22(1):1-4.
- [9] 王东.农产品玉米赤霉醇 ELISA 检测试剂盒的研制与应用[D].长沙:湖南农业大学,2015.
- [10] JI F, MOKOENA M P, ZHAO H Y, et al. Development of an immunochromatographic strip test for the rapid detection of zearalenone in wheat from Jiangsu province, China [J/OL]. PLoS One, 2017,12(5):e0175282 [2018-01-20]. https://doi:10.1371/journal.pone.0175282.
- [11] HU X F, ZHANG G P. An immunochromatographic test strip to detect ochratoxin A and zearalenone simultaneously [J]. Microbial toxins, 2017,1600:95-105.
- [12] 刘媛,文孟棠,张霄,等.玉米赤霉醇特异性单克隆抗体及其胶体金检测试纸的研制[J].核农学报,2015,29(6):1101-1107.

[J]. 中国农业气象,2011,32(3):456-460,465.

- [4] 陈怀亮,邹春辉,付祥建,等.河南省小麦干热风发生规律分析[J].自然资源学报,2001,16(1):59-64.
- [5] 喇永昌,张磊,张晓煜,等.小麦干热风气象灾害研究综述[J].农村经济与科技,2017,28(1):7-9.
- [6] 陈继珍,王咏青,张杰.河南省小麦干热风气候特征及其对小麦产量的影响[J].安徽农业科学,2012,40(12):7152-7154.
- [7] 张志红,成林,李书岭,等.我国小麦干热风灾害研究进展[J].气象与环境科学,2013,36(2):72-76.
- [8] 张有菊,张春,杨建华.2014 年济阳县冬小麦干热风条件下提早成熟但仍然高产的气象条件分析[J].河北农业科学,2015,19(2):87-90.
- [9] 贾敬习.新乡市小麦干热风的发生及防御研究[J].现代农业科技,2008(21):218-219.
- [10] 郑秀琴.对小麦生长模型 WheatSM 改进研究[D].北京:中国农业大学,2005.

科技论文写作规范——引言

扼要地概述研究工作的目的、范围、相关领域的前人工作和知识空白、理论基础和分析、研究设想、研究方法和实验设计、预期结果和意义等。一般文字不宜太长,不需做详尽的文献综述。在最后引出文章的目的及试验设计等。“引言”两字省略。