



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110441518 A

(43)申请公布日 2019.11.12

(21)申请号 201910644052.5

(22)申请日 2019.07.17

(71)申请人 北京勤邦生物技术有限公司

地址 102206 北京市昌平区回龙观国际信
息产业基地高新四街8号

(72)发明人 吴小胜 何方洋 王琳琛 崔廷婷
万宇平 马玉华 王同坤 王兆芹

(51)Int.Cl.

G01N 33/558(2006.01)

G01N 33/532(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

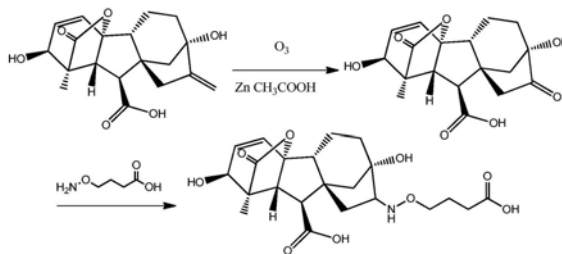
权利要求书1页 说明书7页 附图1页

(54)发明名称

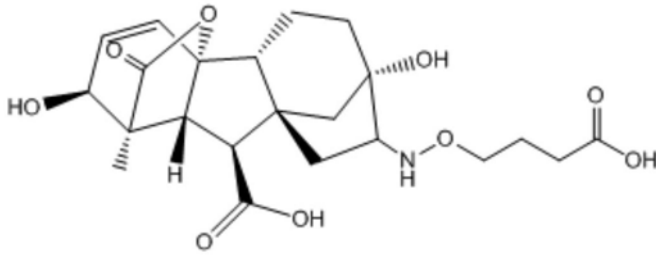
一种检测赤霉素的试纸条及方法

(57)摘要

本发明公开了一种检测赤霉素的试纸条及方法。该试纸条包括样品吸收垫、结合物释放垫、反应膜、吸水垫和底板,所述反应膜上具有包被有赤霉素半抗原-载体蛋白偶联物的检测线和包被有羊抗鼠抗抗体的质控线,所述结合物释放垫上喷涂有赤霉素单克隆抗体-胶体金标记物。本发明还提供一种应用上述试纸条检测样品中赤霉素的方法。本发明提供的试纸条具有操作简单、灵敏度高、检测速度快、成本低、适于大批量样本筛查等优点,能够满足我国食品监管部门开展现场监控和检测工作。



1. 一种检测赤霉素的试纸条,包括样品吸收垫、结合物释放垫、反应膜、吸水垫和底板,所述反应膜上具有包被有赤霉素半抗原-载体蛋白偶联物的检测线和包被有羊抗鼠抗抗体的质控线,所述结合物释放垫上喷涂有赤霉素单克隆抗体-胶体金标记物;所述赤霉素单克隆抗体是以赤霉素半抗原-载体蛋白偶联物作为免疫原制备获得;所述赤霉素半抗原-载体蛋白偶联物由赤霉素半抗原与载体蛋白偶联得到,所述载体蛋白为牛血清白蛋白、卵清蛋白、血蓝蛋白、甲状腺蛋白或人血清白蛋白,其特征在于所述赤霉素半抗原是由赤霉素氧化后再与丁酸羟肟反应得到,其分子结构式为:



2. 如权利要求1所述的试纸条,其特征在于所述样品吸收垫、结合物释放垫、反应膜、吸水垫依次粘贴在底板上。

3. 如权利要求1-2任一项所述的试纸条,其特征在于所述结合物释放垫1/3~1/2被覆盖于样品吸收垫下。

4. 一种制备权利要求1-3任一项所述试纸条的方法,其包括步骤:

- 1) 制备喷涂有赤霉素单克隆抗体-胶体金标记物的结合物释放垫;
- 2) 制备具有包被有赤霉素半抗原-载体蛋白偶联物的检测线和包被有羊抗鼠抗抗体的质控线的反应膜;
- 3) 将1)和2)制备好的结合物释放垫、反应膜与样品吸收垫、吸水垫和底板组装成试纸条。

5. 一种检测豆芽样本中赤霉素残留的方法,其包括步骤:

- 1) 样品前处理;
- 2) 用权利要求1-3任一项所述的试纸条进行检测;
- 3) 分析检测结果。

一种检测赤霉素的试纸条及方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种检测赤霉素的试纸条及方法,具体涉及一种用于检测赤霉素的胶体金试纸条,其特别适用于豆芽中赤霉素残留的检测。

背景技术

[0002] 赤霉素是一种广谱性植物生长调节剂,几乎在植物生长、发育的各个阶段都起着调节作用,尤其对蔬菜水果等有显著的增产效果。赤霉素目前被广泛用作无根豆芽的生长调节剂。人体摄入过多赤霉素可能干扰人体正常的内分泌系统,长期食用会在人体中蓄积,造成器官的慢性中毒,并可能引起癌变,严重危害消费者的身心健康。我国原国家食品药品监督管理局、农业部、国家卫生和计划生育委员会关于豆芽生产过程中禁止使用赤霉素等物质的公告(2015年第11号)中规定:生产者不得在豆芽生产过程中使用赤霉素、4-氯苯氧乙酸钠、6-苄基腺嘌呤等物质,豆芽经营者不得经营含有赤霉素、4-氯苯氧乙酸钠、6-苄基腺嘌呤等物质的豆芽。

[0003] 目前已报道的检测赤霉素的方法主要是液相色谱法、液相色谱串联质谱法等仪器方法。这些方法均须在实验室条件下操作,样品前处理繁琐费时,还需配备昂贵的仪器设备,检测成本较高、耗时长、操作复杂,在实际应用过程中有很大的限制性,难以满足大量样品和现场样品快速检测的需要。因此,开发一种简单快速、适于豆芽中赤霉素残留的胶体金试纸条,可满足大量样品现场筛选和监控,能够更好地满足我国食品监管部门等开展检测工作。

发明内容

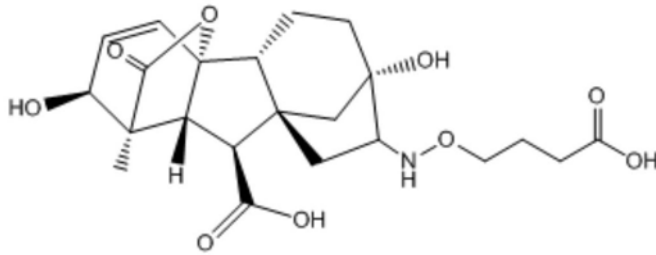
[0004] 本发明的目的在于提供一种能够检测豆芽中赤霉素残留的胶体金试纸条,并且提供一种高效、准确、简便、适于现场监控和大量样本筛查的检测方法。

[0005] 本发明所提供的检测赤霉素的试纸条,包括样品吸收垫、结合物释放垫、反应膜、吸水垫和底板;所述反应膜上具有包被有赤霉素半抗原-载体蛋白偶联物的检测线和包被有羊抗鼠抗抗体的质控线;所述结合物释放垫上喷涂有赤霉素单克隆抗体-胶体金标记物。

[0006] 所述赤霉素单克隆抗体是以赤霉素半抗原-载体蛋白偶联物作为免疫原制备获得。

[0007] 所述赤霉素半抗原-载体蛋白偶联物由赤霉素半抗原与载体蛋白偶联得到,所述载体蛋白为牛血清白蛋白、卵清蛋白、血蓝蛋白、甲状腺蛋白或人血清白蛋白,所述赤霉素半抗原是由赤霉素氧化后再与丁酸羟肟反应得到,其分子结构式为:

[0008]



[0009] 所述样品吸收垫、结合物释放垫、反应膜、吸水垫依次粘贴在底板上,所述结合物释放垫1/3~1/2被覆盖于样品吸收垫下。

[0010] 所述底板可为PVC底板或其他硬质不吸水的材料;所述样品吸收垫可为吸滤纸或滤油纸;所述结合物释放垫可为玻璃棉或聚酯材料;所述吸水垫为吸水纸;所述反应膜可为硝酸纤维素膜或醋酸纤维素膜。

[0011] 本发明的另一个目的是提供一种制备上述试纸条的方法,其包括步骤:

[0012] 1) 制备喷涂有赤霉素单克隆抗体-胶体金标记物的结合物释放垫;

[0013] 2) 制备具有包被有赤霉素半抗原-载体蛋白偶联物的检测线和包被有羊抗鼠抗抗体的质控线的反应膜;

[0014] 3) 将1)和2)制备好的结合物释放垫、反应膜与样品吸收垫、吸水垫和底板组装成试纸条。

[0015] 具体地说,步骤包括:

[0016] 1) 将赤霉素氧化后再与丁酸羟肟反应,制备赤霉素半抗原;

[0017] 2) 将赤霉素半抗原与载体蛋白偶联,制备赤霉素半抗原-载体蛋白偶联物;

[0018] 3) 用赤霉素半抗原-载体蛋白偶联物免疫小鼠,将小鼠脾细胞和小鼠骨髓瘤细胞通过融合、筛选,得到分泌赤霉素单克隆抗体的杂交瘤细胞株;

[0019] 4) 提取小鼠IgG免疫健康山羊,得到羊抗鼠抗抗体;

[0020] 5) 分别将赤霉素半抗原-载体蛋白偶联物和羊抗鼠抗抗体包被于反应膜的检测线(T)和质控线(C)上;

[0021] 6) 用柠檬酸三钠与氯金酸反应制备胶体金;

[0022] 7) 将制备的赤霉素单克隆抗体加入到制备的胶体金中,得到赤霉素单克隆抗体-胶体金标记物;

[0023] 8) 将赤霉素单克隆抗体-胶体金标记物喷涂在结合物释放垫上,37℃烘1h后取出,置于干燥环境中保存备用;

[0024] 9) 将样品吸收垫用含0.5%牛血清白蛋白、pH为7.2、0.1mol/L的磷酸盐缓冲液浸泡2h,37℃下烘干2h;

[0025] 10) 在底板上按顺序粘贴上样品吸收垫、结合物释放垫、反应膜、吸水垫,结合物释放垫从起始端有1/3区域被样品吸收垫覆盖。最后切成3mm宽的小条,加塑料盒,真空包装,4~30℃条件下保存12个月。

[0026] 本发明的另一个目的是提供一种应用上述试纸条检测豆芽中赤霉素残留的方法,它包括步骤:

[0027] (1) 样品前处理;

[0028] (2) 用试纸条进行检测;

[0029] (3)分析检测结果。

[0030] 本发明的赤霉素快速检测试纸条采用高度特异性的抗体抗原反应及免疫层析分析技术,将赤霉素单克隆抗体-胶体金标记物固定于结合物释放垫上,样品中的赤霉素在流动过程中与结合物释放垫上的赤霉素单克隆抗体-胶体金标记物结合,形成药物-抗体-胶体金标记物。样本中的药物与反应膜检测线上的赤霉素半抗原-载体蛋白偶联物竞争结合赤霉素单克隆抗体-胶体金标记物,根据检测线红色条带深浅来判断待测样品液中是否含有赤霉素残留。

[0031] 检测时,样品经处理后滴入试纸条卡孔内,当赤霉素在样品中的浓度低于检测限或为零时,单克隆抗体-胶体金标记物在层析过程中会与固定在反应膜上的赤霉素半抗原-载体蛋白偶联物结合,在检测线(T)和质控线(C)上各出现一条红色条带,且T线显色比C线显色深或与C线显色一致;如果赤霉素在样品中的浓度等于或高于检测限,单克隆抗体-胶体金标记物会与赤霉素全部结合,从而在T线处因为竞争反应不会与赤霉素半抗原-载体蛋白偶联物结合而不出现红色条带或比C线显色浅。如图3所示。

[0032] 阴性:当质控线(C)显示出红色条带,检测线(T)同时也显示出红色条带,且(T)线颜色接近或深于(C)线时,判为阴性。

[0033] 阳性:当质控线(C)显示出红色条带,而检测线(T)不显色或(T)线颜色浅于(C)线时,判为阳性。

[0034] 无效:当质控线(C)不显示出红色条带,则无论检测线(T)显示出红色条带与否,该试纸条均判为无效。

[0035] 本发明的试纸条具有灵敏度高、特异性强、成本低、操作简单、检测时间短、适合各种单位使用、储存简单、保质期长的优点。用本发明试纸条检测赤霉素残留的方法简便、快速、直观、准确、适用范围广、成本低、易推广使用。

附图说明

[0036] 图1为赤霉素半抗原合成图。

[0037] 图2为试纸条剖面结构示意图。

[0038] 图3为试纸条检测结果判定图。

具体实施方式

[0039] 下面结合具体的实施例来进一步阐述本发明。应理解,这些实施例仅用于说明本发明,而不用来限制本发明的范围。

[0040] 实施例1检测赤霉素的试纸条的制备

[0041] 该试纸条的制备方法主要包括以下步骤:

[0042] 1)制备喷涂有赤霉素单克隆抗体-胶体金标记物的结合物释放垫;

[0043] 2)制备具有包被有赤霉素半抗原-载体蛋白偶联物的检测线和包被有羊抗鼠抗抗体的质控线的反应膜;

[0044] 3)将1)和2)制备好的结合物释放垫、反应膜与样品吸收垫、吸水垫和底板组装成试纸条。

[0045] 下面分步详细叙述:

[0046] 1、赤霉素半抗原的合成(合成路线见附图1)

[0047] 取赤霉素0.35g,加入到50mL0.24mg/mL的臭氧水溶液中,充分搅拌1h,将该反应液加入到含有锌粉1.34g和1mL乙酸的溶液中,继续搅拌2h,停止反应,过滤,除去锌粉,滤液加乙酸乙酯120mL,水50mL,萃取,分离,有机相水洗,浓缩蒸干,二氯甲烷/正己烷(V/V,1/5)65mL重结晶,得到氧化赤霉素0.18g,收率51.42%;

[0048] 取氧化赤霉素0.18g,加乙醇50mL溶解,澄清,加丁酸羟肟0.12g,三氯乙酸0.2mL,室温搅拌3h,停止反应,旋蒸,除去乙醇,加水60mL,加二氯甲烷80mL,萃取,分去水相,有机相蒸干,上硅胶柱,石油醚/乙酸乙酯(V/V,1/1)洗脱分离,得到丁酸-赤霉素半抗原产物0.17g,收率74%。

[0049] 2、免疫原的制备

[0050] 取赤霉素半抗原17mg,加N,N-二甲基甲酰胺(DMF)1mL溶解,加碳化二亚胺(EDC)9.4mg、N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)7.3mg,吹打混匀,室温反应4h,得到半抗原活化液A液;取牛血清白蛋白(BSA)50mg,加0.05mol/L PB缓冲液溶解,得到B液;将A液滴加到B液中,反应2h,0.02mol/L PBS缓冲液透析纯化3天,每天换液3次,得到赤霉素半抗原-BSA偶联物,即为免疫原,分装,-20℃保存。

[0051] 3、包被原的制备

[0052] 取赤霉素半抗原11mg,加DMF 1mL溶解,加乙二醇0.2mL,冷却到0~5℃,滴加氯甲酸异丁酯71μL,继续反应4h,得到半抗原活化液A液;取卵清蛋白(OVA)50mg,加0.05mol/LPB缓冲液溶解,得到B液;将A液滴加到B液中,反应2h,0.02mol/L PBS缓冲液透析纯化3天,每天换液3次,得到赤霉半抗原素-OVA偶联物,即为包被原,分装,-20℃保存。

[0053] 4、赤霉素单克隆抗体的制备

[0054] (1) 动物免疫

[0055] 将步骤2得到的免疫原注入Balb/c小鼠体内,免疫剂量为150μg/只,使其产生抗血清。

[0056] (2) 细胞融合和克隆化

[0057] 取免疫Balb/c小鼠脾细胞,按8:1(数量配比)比例与SP2/0骨髓瘤细胞融合,采用间接竞争ELISA测定细胞上清液,筛选阳性孔。利用有限稀释法对阳性孔进行克隆化,直到得到稳定分泌单克隆抗体的杂交瘤细胞株。

[0058] (3) 细胞冻存和复苏

[0059] 将杂交瘤细胞用冻存液制成 1×10^6 个/mL的细胞悬液,在液氮中长期保存。复苏时取出冻存管,立即放入37℃水浴中速融,离心去除冻存液后,移入培养瓶内培养。

[0060] (4) 单克隆抗体的制备与纯化

[0061] 增量培养法:将杂交瘤细胞置于细胞培养基中,在37℃条件下进行培养,用辛酸-饱和硫酸铵法将得到的培养液进行纯化,得到单克隆抗体,-20℃保存。

[0062] 所述细胞培养基为向RPMI1640培养基中添加小牛血清和碳酸氢钠,使小牛血清在细胞培养基中的终浓度为20%(质量分数),使碳酸氢钠在细胞培养基中的终浓度为0.2%(质量分数);所述细胞培养基的pH为7.4。

[0063] 5、羊抗鼠抗抗体的制备

[0064] 以羊作为免疫动物,以鼠源抗体为免疫原对无病原体羊进行免疫,得到羊抗鼠抗

抗体。

[0065] 6、赤霉素单克隆抗体-胶体金标记物的制备

[0066] (1) 胶体金的制备

[0067] 用双蒸去离子水将1%氯金酸稀释成0.01% (质量分数), 取100mL置于锥形瓶中, 用恒温电磁搅拌器加热至沸腾, 在持续高温、持续搅拌下加入2.5mL 1%柠檬酸三钠, 继续匀速搅拌加热至溶液呈透亮的红色时停止, 冷却至室温后用去离子水恢复到原体积, 4℃保存。制备好的胶体金外观纯净、透亮、无沉淀和漂浮物, 在日光下观察颜色为酒红色。

[0068] (2) 赤霉素单克隆抗体-胶体金标记物的制备

[0069] 在磁力搅拌下, 用0.2mol/L碳酸钾溶液调胶体金的pH值至7.2, 按每毫升胶体金溶液中加入20~50μg抗体的标准向胶体金溶液中加入上述赤霉素单克隆抗体, 继续搅拌混匀30min; 静置10min后加入10%BSA, 使其在胶体金溶液中的终浓度为1%, 静置10min。12000r/min、4℃离心40min, 弃上清液, 沉淀用复溶缓冲液洗涤两次, 用体积为初始胶体金体积1/10的复溶缓冲液将沉淀重悬, 置4℃备用。

[0070] 复溶缓冲液: 含BSA的质量分数为0.1%~0.3%、吐温-80的质量分数0.05%~0.2%、pH7.2的0.02mol/L磷酸盐缓冲液。

[0071] 7、结合物释放垫的制备

[0072] 将结合物释放垫浸泡于含0.5%BSA、pH 7.2、0.5mol/L的磷酸盐缓冲液中, 均匀浸湿1h, 37℃烘3h备用。用Isoflow喷膜仪将制备好的赤霉素单克隆抗体-胶体金标记物均匀喷涂在结合物释放垫上, 每1cm结合物释放垫喷涂0.01mL赤霉素单克隆抗体-胶体金标记物后, 置于37℃环境中 (湿度<20%) 60min后取出, 置于干燥环境 (湿度<20%) 中保存备用。

[0073] 8、样品吸收垫的制备

[0074] 将样品吸收垫置于含0.5%牛血清白蛋白、pH为7.2、0.1mol/L的磷酸盐缓冲液中浸泡2h, 37℃下烘干2h备用。

[0075] 9、反应膜的制备

[0076] 将赤霉素半抗原-卵清蛋白偶联物包被到反应膜上构成检测线, 将羊抗鼠抗抗体包被在反应膜上构成质控线。

[0077] 包被过程: 用磷酸缓冲液将赤霉素半抗原-卵清蛋白偶联物稀释到1mg/mL, 用Isoflow点膜仪将其包被于硝酸纤维素膜上的检测线(T线), 包被量为1.0μL/cm; 用0.01mol/L、pH7.4的磷酸盐缓冲液将羊抗鼠抗抗体稀释到200μg/mL, 用Isoflow点膜仪将其包被于硝酸纤维素膜上的质控线(C线), 包被量为1.0μL/cm。将包被好的反应膜置于37℃条件下干燥2h, 备用。

[0078] 10、试纸条的组装

[0079] 根据附图2所示试纸条剖面结构, 将样品吸收垫(1)、结合物释放垫(2)、反应膜(3)、吸水垫(4)依次按顺序粘贴在PVC底板(7)上; 结合物释放垫从起始端有1/3区域被样品吸收垫覆盖, 结合物释放垫的末端与反应膜的始端相连, 反应膜的末端与吸水垫的始端相连, 样品吸收垫的始端与PVC底板的始端对齐, 吸水垫的末端与PVC底板的末端对齐; 所述反应膜上有检测线(5)和质控线(6), 检测线(T线)和质控线(C线)均为与所述试纸条的长相垂直的条状带; 检测线位于靠近结合物释放垫的末端的一侧; 质控线位于远离结合物释放垫的末端的一侧; 将试纸条用机器切成3mm宽的小条, 装在特制的塑料制卡中, 4~30℃的环境

中贮存,有效期12个月。

[0080] 实施例2豆芽中赤霉素的检测

[0081] 1、样品的前处理

[0082] 用均质器均质豆芽样本(切勿研磨成粉末状);称取 $2.0\text{g} \pm 0.05\text{g}$ 样本至10mL聚苯乙烯离心管中,加入3mL磷酸盐缓冲液,用涡旋混合仪涡动1min混匀;室温($20 \sim 25^\circ\text{C}$)4000r/min离心5min,取上层清液作为待测样本液。

[0083] 2、用试纸条检测

[0084] 用微量移液器吸取待测样本液80 μL 垂直滴于加样孔中;液体流动开始计时,反应8min,判定结果。

[0085] 3、分析检测结果

[0086] 阴性(-):T线显色比C线显色深或与C线显色一致,表示样品中赤霉素浓度低于检测限,如图3a、3b。

[0087] 阳性(+):T线显色比C线显色浅或T线不显色,表示样品中赤霉素浓度等于或高于检测限,如图3c、3d。

[0088] 无效:未出现C线,表明不正确的操作过程或试纸条已变质失效,如图3e、3f。

[0089] 实施例3样品检测实例

[0090] 1、检测限试验

[0091] 取空白豆芽样本,在其中分别添加赤霉素至终浓度为 $50\mu\text{g}/\text{kg}$ 、 $100\mu\text{g}/\text{kg}$ 、 $200\mu\text{g}/\text{kg}$,取试纸条进行检测,每个样本重复测定三次。

[0092] 用试纸条检测豆芽样本时,当其中无赤霉素和其添加浓度为 $50\mu\text{g}/\text{kg}$ 时,试纸条上显示出T线显色比C线显色深或与C线显色一致,呈阴性;当其中赤霉素添加浓度为 $100\mu\text{g}/\text{kg}$ 、 $200\mu\text{g}/\text{kg}$ 时,试纸条上显示出T线显色比C线显色浅或T线不显色,呈阳性,表明本试纸条对豆芽中赤霉素的检测限为 $100\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

[0093] 2、假阳性率、假阴性率试验

[0094] 取空白豆芽样本及添加赤霉素至终浓度为 $100\mu\text{g}/\text{kg}$ 的阳性豆芽样本各20份,用3个批次生产的试纸条分别进行检测,计算其阴阳性率。结果见表1。

[0095] 表1检测豆芽样本结果

| 批次 | 浓度 | 空白豆芽样本 (20份) | 阳性豆芽样本 (20份) |
|--------|----|-----------------|-----------------|
| [0096] | 1 | 20份阴性 | 20份阳性 |
| | 2 | 20份阴性 | 20份阳性 |
| | 3 | 20份阴性 | 20份阳性 |

[0097] 结果表明:用3个批次生产的试纸条检测阳性豆芽样本时,结果全为阳性,可知阳性符合率为100%,假阴性率为0;检测20份阴性豆芽样本时,结果全为阴性,可知阴性符合率为100%,假阳性率为0。说明本发明的检测赤霉素的试纸条可以对豆芽样本中赤霉素残留进行快速检测。

[0098] 3、特异性试验

[0099] 用本试纸条检测 $1000\mu\text{g}/\text{kg}$ 4-氯苯氧乙酸、2,4,5-三氯苯氧乙酸、6-苄基腺嘌呤、

萘乙酸、吲哚乙酸、吲哚丁酸、多效唑、噻苯隆等其他植物生长调节剂时，试纸条上显示出T线显色比C线显色深或与C线显色一致，呈阴性，说明本试纸条对这些药物无交叉反应。

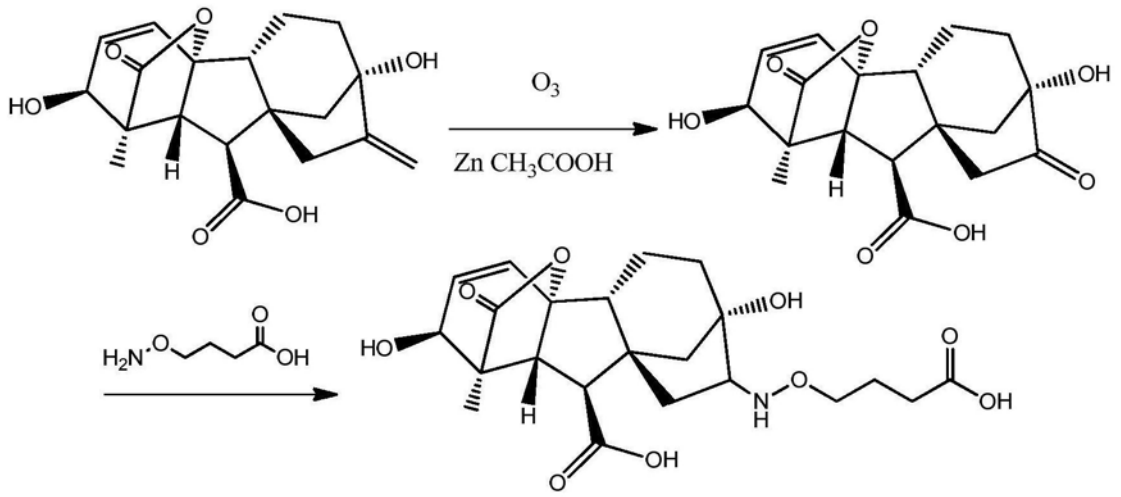


图1

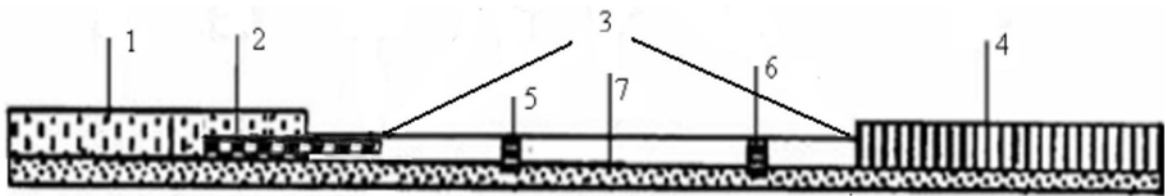


图2

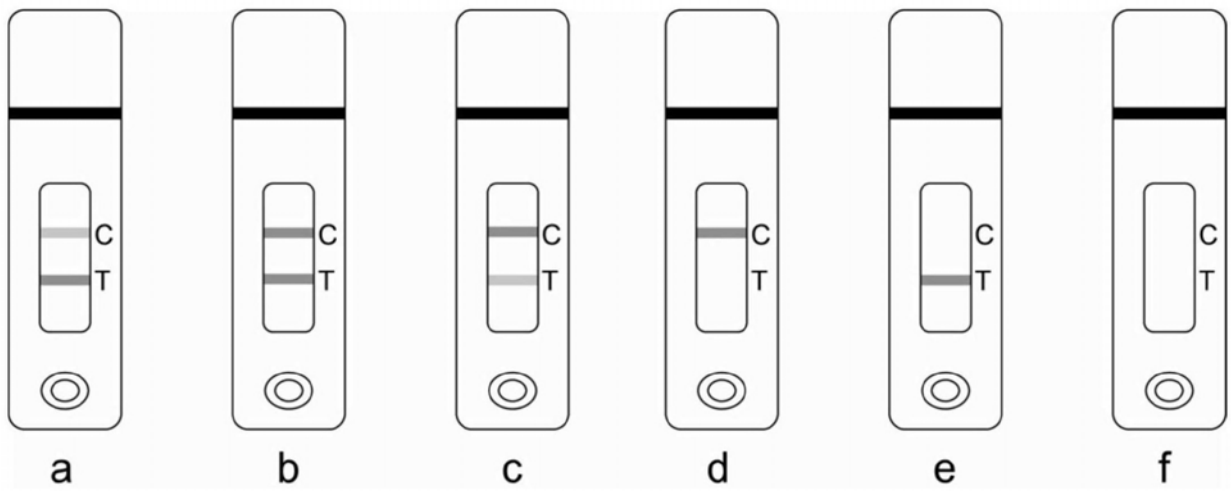


图3

| | | | |
|----------------|------------------------------------------------------|---------|------------|
| 专利名称(译) | 一种检测赤霉素的试纸条及方法 | | |
| 公开(公告)号 | CN110441518A | 公开(公告)日 | 2019-11-12 |
| 申请号 | CN201910644052.5 | 申请日 | 2019-07-17 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 北京勤邦生物技术有限公司 | | |
| 申请(专利权)人(译) | 北京勤邦生物技术有限公司 | | |
| 当前申请(专利权)人(译) | 北京勤邦生物技术有限公司 | | |
| [标]发明人 | 吴小胜 何方洋 王琳琛 崔廷婷 万宇平 马玉华 王同坤 王兆芹 | | |
| 发明人 | 吴小胜 何方洋 王琳琛 崔廷婷 万宇平 马玉华 王同坤 王兆芹 | | |
| IPC分类号 | G01N33/558 G01N33/532 G01N33/543 | | |
| CPC分类号 | G01N33/532 G01N33/54306 G01N33/558 | | |
| 外部链接 | Espacenet SIPO | | |

摘要(译)

本发明公开了一种检测赤霉素的试纸条及方法。该试纸条包括样品吸收垫、结合物释放垫、反应膜、吸水垫和底板，所述反应膜上具有包被有赤霉素半抗原-载体蛋白偶联物的检测线和包被有羊抗鼠抗抗体的质控线，所述结合物释放垫上喷涂有赤霉素单克隆抗体-胶体金标记物。本发明还提供一种应用上述试纸条检测样品中赤霉素的方法。本发明提供的试纸条具有操作简单、灵敏度高、检测速度快、成本低、适于大批量样本筛查等优点，能够满足我国食品监管部门开展现场监控和检测工作。

