

鸡蛋致敏蛋白免疫分析方法的建立

兰丽平¹, 许舒婷¹, 赵杰¹, 郑月明^{1,3}, 高美须¹, 潘家荣^{1,2,*}

(1. 中国农业科学院农产品加工研究所, 农业部农产品加工与质量控制重点实验室, 北京 100193;

2. 中国计量学院生命科学学院, 浙江 杭州 310018; 3. 中国检验检疫科学研究院, 北京 100025)

摘要: 采用硫酸铵沉淀法和离子交换法分离纯化鸡蛋清得致敏蛋白后免疫兔子制备抗多克隆抗体, 并建立快速、灵敏、特异性强的鸡蛋致敏蛋白酶联免疫检测方法。在优化条件下, 鸡蛋致敏蛋白在 $1 \times 10^{-4} \sim 10 \mu\text{g/mL}$ 质量浓度范围内与抑制率线性关系良好, 其线性回归方程为 $y = 0.74145 + 0.21692 \lg C (r = 0.9971)$, 半抑制浓度(IC_{50})和最低检测限(IC_{10})分别为77.076、1.104 ng/mL; 样品加标回收率在98.29%~101.55%之间; 且抗鸡蛋致敏蛋白多克隆抗体对火鸡蛋蛋白、鸭蛋蛋白、鹅蛋蛋白均具有交叉反应, 与花生、小麦蛋白无交叉反应; 批内和批间变异系数分别为4.63%和5.49%, 且可在4℃可保存6个月以上, 能够快速灵敏检测食品中鸡蛋致敏蛋白的存在。

关键词: 鸡蛋致敏蛋白; 酶联免疫法; 多克隆抗体

Establishment of Immunoassay Method for Allergy-Inducing Proteins in Eggs

LAN Li-ping¹, XU Shu-ting¹, ZHAO Jie¹, ZHENG Yue-ming^{1,3}, GAO Mei-xu¹, PAN Jia-rong^{1,2,*}

(1. Institute of Agro-Food Science and Technology, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Key Laboratory of Agro-Food Processing and Quality Control, Ministry of Agriculture, Beijing 100193, China; 2. College of Life Science, China Jiliang University, Hangzhou 310018, China; 3. Chinese Academy of Inspection and Quarantine, Beijing 100025, China)

Abstract: Allergy-inducing proteins in eggs were isolated and purified by ammonium sulfate precipitation and ion exchange chromatography. Polyclonal antibody was generated by inoculated rabbits. A rapid, sensitive and specific ELISA method was developed and optimized for the detection of egg allergy proteins. Under the optimal experimental conditions, a good linear relationship between allergy-inducing proteins and inhibitory rate in the range of $1 \times 10^{-4} \sim 10 \mu\text{g/mL}$ was observed. The regression equation was $y = 0.74145 + 0.21692 \times \lg C (r = 0.9971)$. IC_{50} and IC_{10} were 77.076 ng/mL and 1.104 ng/mL, respectively. The recovery rate of the ELISA method was 70.1%–117.8%. The developed method had cross-reactivity with the proteins from turkey, duck and goose eggs, despite having no cross-reactivity with the proteins from peanut or milk. The variation coefficients of intra-assay and inter-assay were 4.63% and 5.49%, respectively. The shelf life of the prepared immunoassay kit was 6 months during the storage at 4℃ and met the requirements for the analysis of egg allergy proteins with fast operation and high sensitivity.

Key words: egg allergy proteins; enzyme linked immunosorbent assay; polyclonal antibody

中图分类号: R155.5

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2013)06-0134-05

食物过敏反应又称食物超敏反应、食物变态反应(food allergy、food hypersensitivity), 可引发一系列临床症状, 如皮炎、哮喘、腹痛和腹泻等多种症状, 严重的可导致休克。而在众多的食物过敏原中, 鸡蛋是引起儿童及婴幼儿过敏的主要过敏原之一, 据国外流行病学统计, 在食物过敏儿童中, 大约35%的儿童对鸡蛋过敏, 其中一岁前的幼儿更为常见^[1-2]。鸡蛋中主要存在4种致敏蛋白, 即卵类黏蛋白(OVM, 28kD)、卵白蛋白(OVA, 44.5kD)、卵转铁蛋白(OVT, 76kD)和溶菌酶

(Lys, 14.3kD), 且都位于蛋清中, 它们分别占蛋清含量的11%、54%、12%、3.4%^[3-4], 所占比例很高。但是, 目前缺乏针对鸡蛋致敏蛋白高效、准确的检测方法。已有的致敏蛋白检测方法有皮肤实验、双盲对照食物激发实验、组胺释放实验和IgE检测, 前两者对实验条件要求比较苛刻, 并且对实验者造成创伤和极大痛苦, 后两者操作复杂、耗时长^[5-6]。而酶联免疫吸附法是在免疫学和细胞工程学基础上发展的一种微量检测技术, 灵敏度高、特异性强且可同时检测多个样品, 备受青睐, 现已在牛

收稿日期: 2011-11-23

基金项目: “十一五”国家科技支撑计划项目(2006AA10Z449); 国家公益性行业科研专项(201103007)

作者简称: 兰丽平(1985—), 女, 硕士研究生, 研究方向为食物过敏原。E-mail: lanliping0515@126.com

*通信作者: 潘家荣(1964—), 男, 研究员, 博士, 研究方向为食品安全检测技术。E-mail: panjr@263.net

血清蛋白、甲胎蛋白、农药残留和兽药残留等检测方面得到广泛应用。因此本研究拟以兔抗鸡蛋致敏蛋白多克隆抗体为基础,旨在建立食物中鸡蛋致敏蛋白的酶联免疫吸附(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)检测方法。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

卵白蛋白、卵转铁蛋白、溶菌酶标准品、弗氏完全佐剂、弗氏不完全佐剂、DEAE-Sepharose FF层析介质美国Sigma公司;再生纤维素微孔滤膜(0.45 μ m, Φ 33mm)美国Millipore公司;预染蛋白Marker(14.4~97kD)、透析带、羊抗兔二抗(HRP-IgG) 北京索莱宝生物科技有限公司;新鲜鸡蛋购自市场;健康雄性成年2kg新西兰大白兔 北京兴隆实验动物养殖场。

1.2 仪器与设备

低温冷冻高速离心机 美国Sigma公司;冷冻干燥机 北京博医康公司;紫外分光光度计 北京普析通用仪器有限责任公司;电脑恒温层析柜、DHL-A电脑恒流泵、HID-3紫外检测仪、BSZ-100自动部分收集器 上海青浦沪西仪器厂;凝胶成像系统(Tanon3500)/垂直板型电泳槽、直流稳压电源 美国Bio-Rad公司;酶联免疫检测仪 美国Thermo公司;96孔聚苯乙烯酶标板 美国Corning公司。

1.3 致敏蛋白提取、纯化及鉴定

专取鸡蛋清用PBS稀释10倍,搅拌均匀后于4℃静置提取48h, 15000r/min离心15min收集上清液得致敏原粗液,经离子交换色谱法纯化得主要致敏原后用十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)进行鉴定,具体参考文献[7-9]。

1.4 抗体制备、纯化及效价鉴定

初免为致敏原液与弗氏完全佐剂等量混合,完全乳化后皮下多点注射免疫2kg雄性成年新西兰大白兔,剂量为0.5mg/kg。2周后改为弗氏不完全佐剂以相同剂量和方法进行免疫,此后每周一次。从第3次免疫开始,每次免疫后的第7天耳缘静脉采血,并用间接非竞争ELISA法测定抗血清效价,达要求后1周进行冲击免疫,7d后心脏采血,收集于灭菌平皿中,使之凝固,然后3000r/min离心5min收集血清并分装冻存。

血清经辛酸-硫酸铵法粗提后用rProtein A Sepharose Fast Flow血清纯化柱纯化,并用SDS-PAGE对抗体纯度及分子量进行分析。抗体的效价:用间接非竞争ELISA法进行测定。抗体含量测定:用紫外分光光度法测纯化后抗体含量^[10]。

1.5 酶联免疫检测方法的建立

1.5.1 抗原抗体最佳工作浓度的确立

棋盘法测定抗原抗体最佳工作浓度。包被:用0.05mol/L碳酸盐缓冲溶液(CBS, pH9.6)配制不同梯度的抗原包被液,每孔加100 μ L, 4℃包被过夜;洗板:以磷酸盐缓冲溶液[PBST, pH7.4, 0.01mol/L PBS, 含0.05%(V/V)Tween-20]洗板3次,每次5min;封闭:加200 μ L 5%的脱脂奶粉(m/m, PBS, pH7.4, 含0.1% Tween-20)于37℃封闭2h;洗板;加一抗:将抗体进行梯度稀释,每孔100 μ L,对照阴性血清稀释4000倍,37℃温育1h;洗板;加二抗:将二抗按照说明书稀释2000倍,每孔加100 μ L, 37℃温育1h;洗板;显色:每孔加50 μ L TMB显色液, 37℃温育15min后加50 μ L 2mol/L H₂SO₄终止反应,酶标仪上测定450nm处光密度值(OD_{450nm})。选OD_{450nm}值接近1的抗原抗体浓度为最佳工作浓度。

1.5.2 标准曲线的绘制

用PBS溶液配制不同浓度的鸡蛋致敏蛋白标准溶液,用上述实验所测得的抗原、抗体最佳稀释倍数,进行间接竞争ELISA(Ci-ELISA)测定抗体对抗原的抑制率,以蛋白浓度的对数值为横坐标、抑制率(inhibition ratio, IC)为纵坐标绘制抑制率标准曲线,其中 $IC = (OD_{\text{对照孔}} - OD_{\text{不同浓度抗原}}) / OD_{\text{对照}}$ 。

1.5.3 方法的回收率实验

根据本方法的检测范围确定加标浓度,在小麦粉和玉米粉中分别进行了3个浓度的加标回收实验,每个浓度分别设5个重复,共进行3次回收实验。样品的前处理方法:样品粉碎后过60目筛,称取5g加入乙醇溶液(20:80, V/V)25mL,在100W的超声波中提取1h,离心(9000r/min, 15min, 室温),取上清液。滤液用纯水稀释10倍进行检测。样品中鸡蛋致敏蛋白的浓度/(μ g/kg)= MNY/W 。式中: M 为实验所测鸡蛋蛋白浓度,根据标准曲线求得; N 为样品提取液的体积/mL; Y 为样品稀释倍数; W 为样品质量/g。

1.5.4 方法的稳定性实验

稳定性通过37℃加速破坏实验进行研究(所用试剂在37℃放置24h相当于在4~10℃放置45d)。将所用试剂放于37℃环境中,每隔24h用ELISA法测定阳性和阴性的光密度值。以 $OD_{\text{阳}}/OD_{\text{阴}} > 2.1$ 为有效; $1.5 < OD_{\text{阳}}/OD_{\text{阴}} < 2.1$ 为可疑; $OD_{\text{阳}}/OD_{\text{阴}} < 1.5$ 为失效^[11]。

1.5.5 特异性实验

用硫酸铵沉淀法分别提取火鸡蛋蛋白、鸭蛋白、鹅蛋白、牛奶蛋白、花生蛋白并进行梯度稀释,按照Ci-ELISA法操作步骤测定其OD₄₅₀值,绘制竞争抑制曲线,并计算各自的IC₅₀,按照下述公式计算交叉反应率(cross-reaction, CR): $CR/\% = [IC_{50}(\text{鸡蛋蛋白})/IC_{50}(\text{其他蛋白})] \times 100$ 。

1.5.6 重复性实验

重复性检验包括批内和批间重复性检验。用同一批

和不同批配制的试剂，对不同包被浓度的抗原进行Ci-ELISA，测出OD值，分别得出批内变异系数(vatiation coefficients of intra-assay)和批间变异系数(vatiation coefficients of inter-assay)。

1.5.7 再现性实验

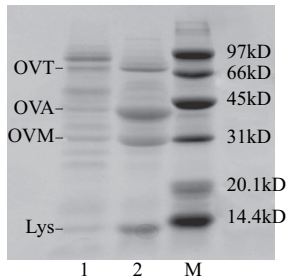
用同一批次配制的试剂，选择3个水平的鸡蛋致敏蛋白，由不同的人员在同一实验室和同一人员在不同的实验室进行操作，根据B/B₀值的变化确定该方法的再现性。

1.5.8 样品检测

从市场购买多种标签中标注含鸡蛋和不含鸡蛋的食品，按照上述样品处理方法进行处理，然后采用间接竞争ELISA法进行测定，并对结果进行分析比较。

2 结果与分析

2.1 致敏蛋白纯化及鉴定



1. PBS浸提的蛋白；2.离子交换色谱纯化后的蛋白液；M.蛋白标准分子质量Marker。

图1 鸡蛋致敏蛋白电泳图

Fig.1 Electrophoresis of egg allergy proteins

如图1所示，鸡蛋清蛋白粗提后，经SDS-PAGE电泳结果显示(泳道1)有10多条粗细不同的蛋白条带，离子交换色谱纯化后经SDS-PAGE鉴定，所得到的主要条带如图所示(泳道2)。黄峙等^[6]和沈关心等^[6]对鸡蛋清致敏原进行研究得到了OVT、OVA、OVM和Lys，其分子质量分别为76、44.5、28kD和14.3kD。这说明本研究提取到了鸡蛋清中的主要致敏原蛋白成分。

2.2 多克隆抗体特性鉴定

表1 效价的测定

Table 1 Measurement of titers

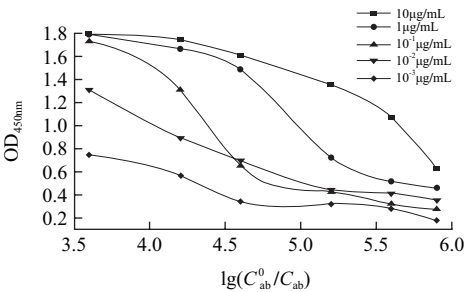
抗体稀释度	抗原浓度下的OD ₄₅₀					
	10	1	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴
1:4.0×10 ³	1.792	1.7890	1.6985	1.1070	0.7445	0.4755
1:1.6×10 ⁴	1.643	1.6640	1.3070	0.8950	0.5635	0.3295
1:4.0×10 ⁴	1.409	1.3855	0.8505	0.6950	0.3415	0.2215
1:1.6×10 ⁵	1.151	1.0720	0.4250	0.4410	0.3195	0.2025
1:4.0×10 ⁵	0.871	0.7550	0.3195	0.3080	0.2815	0.2016
1:8.0×10 ⁵	0.527	0.4580	0.2730	0.3550	0.1785	0.1967
阴性	0.249	0.2200	0.2195	0.2395	0.2005	0.1925

根据经验公式计算抗体蛋白的浓度：鸡蛋抗体蛋白浓度/(mg/mL)=1.45OD₄₅₀-0.74OD₂₆₀=2.317mg/mL。采用间接ELISA法测定抗鸡蛋清主要致敏蛋白血清的效价，以阳性血清OD₄₅₀≥阴性对照的2.1倍作为抗血清的效价，测定结果见表1，有表可知，效价为8×10⁵。

2.3 间接ELISA方法的建立

2.3.1 抗原抗体最佳工作浓度的确定

抗原以10、1、1×10⁻¹、1×10⁻²、1×10⁻³μg/mL和1×10⁻⁴μg/mL进行梯度稀释，抗体以2×10³、4×10³、1.6×10⁴、4×10⁴、1.6×10⁵、4×10⁵、8×10⁵倍数进行梯度稀释。如图2所示，抗原在10、1μg/mL时包被浓度都已接近饱和，但是1μg/mL这条线在4.25~6.5之间变化比较灵敏，之外变化趋于平缓，呈现出了OD值随抗原抗体浓度变化而变化的整体趋势，所以选1μg/mL作为抗原最佳工作浓度。此时选择4.25~6.5灵敏变化区间中间部位且OD值接近1的抗体浓度为最佳工作浓度，此浓度为1:50000。



C_{ab}⁰、C_{ab}⁰分别为抗体稀释前后质量浓度，C_{ab}⁰/C_{ab}⁰为抗体的稀释倍数。

图2 抗原抗体最佳工作质量浓度的测定

Fig.2 The optimal concentration of Ag/Ab

2.3.2 标准曲线

用间接竞争ELISA制作标准曲线，将标准品按照100、10、1、1×10⁻¹、1×10⁻²、1×10⁻³μg/mL和1×10⁻⁴μg/mL进行梯度稀释，结果如图3所示，线性方程为：y=0.2169x+0.7415(R=0.9971)，鸡蛋蛋白质量浓度在10⁻⁴~10μg/mL之间与抑制率呈现良好的线性关系，IC₅₀=0.077076μg/mL，最低检测限IC₁₀=0.001104μg/mL，与国外同类试剂盒最低检测限(0.78ng/mL)接近。

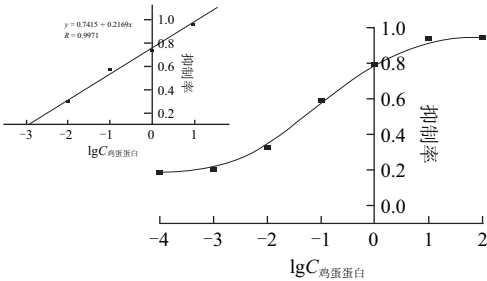


图3 间接竞争标准曲线

Fig.3 Standard curve for indirect competitive ELISA

2.3.3 回收率测定

采用所建立的方法对鸡蛋致敏蛋白进行了加标测定。由表2可知,对小麦和玉米的3个加标水平的平均回收率分别为98.23%、94.56%和112.17%,符合技术要求(70%~120%),在理想回收率(90%~105%)范围之内。

表2 样品的加标回收率
Table 2 Recovery rates of spiked samples

加标水平/ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	平均回收率/%		标准差/%	
	小麦	玉米粉	小麦	玉米粉
10	98.29	98.23	1.216	1.895
900	101.55	94.56	2.659	1.823
8000	98.40	112.17	1.824	1.612

2.3.4 方法的稳定性实验

经37℃稳定性实验,各试剂在37℃条件下存放96h后,所测光密度值 $\text{OD}_{\text{阳}}/\text{OD}_{\text{阴}} \leq 2.1$,可得出本方法所用试剂在4℃可保存6个月。

2.3.5 方法的特异性测定

采用间接竞争ELISA测鸡蛋蛋白、火鸡蛋蛋白、鸭蛋蛋白、鹅蛋蛋白、花生蛋白及牛奶蛋白,结果见图4,竞争曲线除花生蛋白和牛奶蛋白外曲线趋于平缓外,其余4种都随抑制蛋白浓度的增加而下降。说明该方法所用多克隆抗体与鸭蛋等中的致敏蛋白有交叉反应而与小麦、花生蛋白无交叉反应,与火鸡蛋中的蛋白交叉反应率为31.22%,与鸭蛋蛋白交叉反应率为9.71%,与鹅蛋蛋白交叉反应率为8.79%。所以该检测方法不仅可以用于鸡蛋制品中致敏蛋白的检测,同时可以检测其他种类蛋制品中的致敏蛋白。

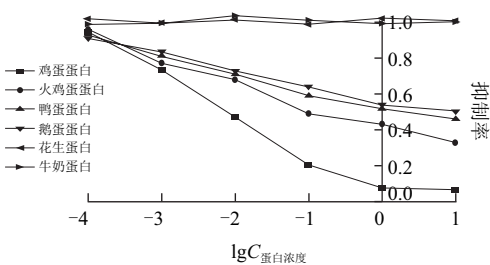


图4 间接ELISA测定与其他几种蛋白的交叉反应

Fig.4 Cross-reaction of the indirect ELISA method with several other proteins

2.3.6 间接ELISA重复性实验

表3 变异系数的测定
Table 3 Determination of variation coefficients

鸡蛋致敏蛋白水平/($\mu\text{g}/\text{mL}$)	批内变异系数/%	批间变异系数/%
5	5.94	6.77
1	4.68	5.49
0.2	3.28	4.20
平均值/%	4.63	5.49

用3个不同的抗原浓度进行包被,经ELISA进行测定,得出批内和批间变异系数,见表3。批内变异系数低于5%,批间变异系数低于10%,符合诊断试剂的要求,试剂稳定性较好。

2.3.7 方法的再现性

同一批次制备的试剂,不同人员在同一实验室以及同一人员在不同实验室,选择0.01、0.22、5.40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 3个鸡蛋蛋白水平进行检测,得出 B/B_0 ,见图5,将 B/B_0 值进行统计学分析,差异不显著($P>0.05$)。

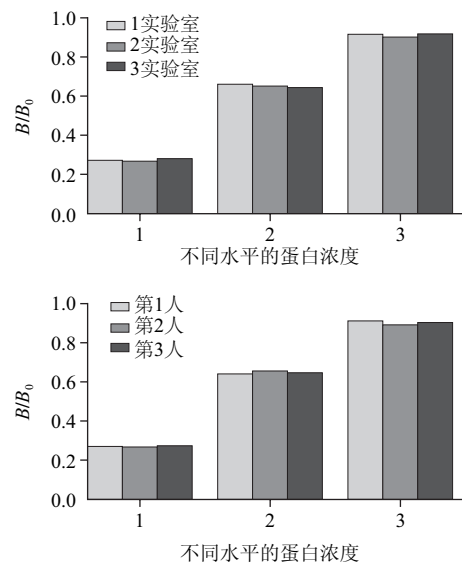


图5 方法的再现性实验结果

Fig.5 Reproducibility of the developed method

2.3.8 食品中鸡蛋过敏成分的检测

表4 来自不同地区样本的测定
Table 4 Detection of samples from different areas

食品	产地	包装标示是否含有鸡蛋	定性测定结果
老北京桃酥王	河北	是	阳性
白果苏式月饼	杭州	否	阴性
双色曲奇	北京	是	阳性
奶酪夹心巧克力派	北京	是	阳性
奥利恩麦饼	韩国	否	阴性
海太花生饼	韩国	是	阳性
牛奶巧克力	德国	否	阴性
牛奶棒棒饼	马来西亚	否	阴性
散装沙琪玛	北京	不详	阳性
土司面包	北京	不详	阳性

注:阳性为测定结果与空白对照的OD值比大于2.1倍,阴性则为小于2.1倍。

提取10种食品中的蛋白成分(依照1.4.3节所建立的提取方法),以本实验所建立的间接ELISA法进行检测,重复检测3次。检测结果见表4。在10种食品中,有4种食品含有鸡蛋成分,检测结果均呈现阳性。4种食品不含鸡蛋成分,检测结果均呈阴性,其中两种标示不详,检测结

果均呈阳性。说明本方法对于未标明鸡蛋过敏原成分的食品检测具有较好的实际应用价值。

3 讨论

鸡蛋过敏严重影响了部分人群的生活质量,尤其是儿童,严重的甚至会导致儿童过敏性死亡^[12-14]。为此,欧美等发达国家相继出台了规范食品中过敏物质标示的法律法案,对标签上过敏成分的标注做了严格的规定,此外,对部分进口食品进行过敏原成分检测。而中国在食品致敏方面的研究刚刚起步,远远落后于国外发达国家,在中国《预包装食品中的致敏原成分》(GB/T 23779—2009)法规中,规定了预包装食品中的致敏原成分,在《预包装食品标签通则》(GB 7718—2011)只是增加了食品中可能含有致敏物质时的推荐标示要求,没有强制各食品生产厂对过敏原成分进行标注。国内食品过敏成分检测技术落后,导致部分出口食品因为过敏原标注不明而遭遇退货^[13-16]。因此,建立快速、标准化、高灵敏度的食品过敏原检测技术极其重要。

现在市面上已有检测鸡蛋致敏蛋白的试剂盒和试纸条,其中试剂盒只是以鸡蛋中一种致敏蛋白质即卵类粘蛋白(约占蛋清蛋白含量的11%)作为检测目标,测定范围在 $0.78 \times 10^{-3} \sim 5 \times 10^{-2} \mu\text{g/mL}$ 之间。鸡蛋致敏蛋白检测试纸条虽然结果直观可见,但是只能定性不能定量。而本研究是本研究采用间接ELISA法进行检测,以鸡蛋中4种主要致敏蛋白(约占蛋清蛋白含量的77%)为检测目标,检测范围为 $1 \times 10^{-4} \sim 10 \mu\text{g/mL}$,具有更低的检测限和更宽的检测范围,能够更加灵敏的检测食品中鸡蛋中致敏蛋白的成分。

参考文献:

- [1] 顾可飞,李春红,高美须,等.食物过敏原及检测技术的研究进展[J].食品科技,2006,31(8):1-5.
- [2] 周超,潘红英,王秀敏.小儿鸡蛋过敏33例临床分析[J].中国妇幼保健,2005,20:2226-2227.
- [3] 佟平,高金燕,陈红兵.鸡蛋清中主要过敏原的研究进展[J].食品科学,2007,28(8):565-567.
- [4] JESSIA H, SAVAGE M D, ELIZABETH C, et al. The natural history of egg allergy[J]. J Allergy Clin Immunol, 2007, 120(6): 1413-1417.
- [5] 张在军.多种食品过敏原体外快速检测技术的研究[D].广州:暨南大学,2005.
- [6] 黄峙,郭宝江.食品过敏原检测与评价技术研究进展[J].食品科学,2004,25(8):240-244.
- [7] 麻小娟,习斌蓉,陈红兵,等.一步法分离鸡蛋清中三种主要过敏原的研究[J].食品科学,2009,30(22):40-43.
- [8] MINE Y, ZHANG J W. The allergenicity of ovomucoid and the effect of its elimination from hen's egg white[J]. J Sci Food Agric, 2001, 81(13): 1540-1546.
- [9] 吴序栎,杨志华,刘志刚,等.鸡蛋过敏原分离、鉴定与纯化[J].中国公共卫生,2009,25(1):127-128.
- [10] 沈关心,龚非力.抗体技术实验指南[M].北京:科学出版社,2003.
- [11] 宋宏新,赵晓红.食品免疫学[M].北京:中国轻工业出版社,2009.
- [12] ALLAN B S, ANNE M, HUGH A. Further fatalities caused by anaphylactic reactions to food, 2001-2006[J]. J Allergy Clin Immunol, 2007, 119(4): 1016-1018.
- [13] BUCHANAN A, JONES S M, CHRISTIE L, et al. Treatment of egg allergy in children through oral desensitization[J]. J Allergy Clin Immunol, 2005, 115(2): 57-63.
- [14] CHRISTIE L, ALTHAGE K A, BURKS A W, et al. Threshold dose for egg allergy during egg desensitization procedure[J]. J Allergy Clin Immunol, 2005, 168(2): 92-97.
- [15] 周淑红.国外关于食品过敏标签的现状 & 启示[J].世界农业,2007(6):67-68.
- [16] 国家质量监督检验检疫总局,中国国家标准化管理委员会. GB/T 23779—2009 预包装食品中的致敏原成分[S].北京:中国标准出版社,2009.