



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 107505419 B

(45)授权公告日 2020.05.19

(21)申请号 201710654982.X

CN 103376319 A, 2013.10.30,

(22)申请日 2017.08.03

CN 104597237 A, 2015.05.06,

(65)同一申请的已公布的文献号

CN 106290896 A, 2017.01.04,

申请公布号 CN 107505419 A

李旭 等.采用免疫亲和柱高效液相色谱法
检测稻米中的黄曲霉毒素B1.《西华大学学报(自
然科学版)》.2014,第33卷(第4期),

(43)申请公布日 2017.12.22

Sun Yue et al..Simultaneous Detection
of Ochratoxin A and Fumonisin B1 in
Cereal Samples Using an Aptamer-Photonic
Crystal Encoded Suspension Array.《Anal.
Chem.》.2014,

(73)专利权人 南京师范大学

石飞云 等.花生中黄曲霉毒素检测方法的
研究.《中国卫生检验杂志》.2012,第22卷(第11
期),

地址 210023 江苏省南京市仙林大学城文
苑路1号

(72)发明人 李建林 郑茜 李玮 郑铁松
金岩昊 李奕辰 李亚维 马六十
刘妍 丁志 邓杨 朱瑞雪
蔡婷婷

Chengxin Luan et al..Responsive
photonic encoded breathing microbeads
based microfluidic chip for multiplex
fluorescent immunoassay.《Sensors and
Actuators B: Chemical》.2016,

(74)专利代理机构 南京苏高专利商标事务所
(普通合伙) 32204

宋楠 等.高效液相色谱法测定坚果类食品
中的黄曲霉毒素.《中国校医》.2012,第26卷(第
12期),

代理人 孙斌

Jingjing Xu et al..Microfluidic
fabrication of photonic encoding
magnetized silica microspheres for
aptamer-based enrichment of Ochratoxin A.
《Microchim Acta》.2017,

(51)Int.Cl.

审查员 黎作佳

G01N 30/06(2006.01)

权利要求书1页 说明书5页 附图2页

G01N 30/02(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

(56)对比文件

CN 106540473 A, 2017.03.29,

够富集AFB1量最多达到50ng,标品的洗脱率能达
到90%;同时本发明的制备方法简单方便,原料
价格低廉,节约成本。通过该修饰反蛋白石光子
晶体微球用于富集、净化、检测农产品中的AFB1
的方法富集毒素的效果好,同时能够节约装填柱
子的过程,使得操作更简易方便。

CN 101251538 A, 2008.08.27,

CN 102879570 A, 2013.01.16,

CN 103344759 A, 2013.10.09,

(54)发明名称

一种用于富集、净化、检测AFB1的修饰反蛋白
石光子晶体微球及其制备方法和应用

B (57)摘要

本发明公开了一种用于富集、净化、检测
AFB1的修饰反蛋白石光子晶体微球及其制备方
法和应用;该修饰反蛋白石光子晶体微球可以有
效地特异性富集、净化黄曲霉毒素;使用30ul修
饰反蛋白石光子晶体微球作为免疫亲和材料,能

1. 一种用于富集、净化、检测AFB₁的修饰反蛋白石光子晶体微球,其特征在于,由反蛋白石光子晶体微球作为免疫亲和材料的载体,对微球进行羟基化修饰、氨基修饰和醛基修饰,再在微球表面修饰固定上AFB₁单克隆抗体制成;

所述的修饰反蛋白石光子晶体微球的制备方法:

(1) 反蛋白石光子晶体微球的制备:将二氧化硅和聚苯乙烯混合纳米乳液作为水相,将甲基硅油作为油相,使油相截断水相形成油包水型微球;将油包水型微球加热至水分蒸发完全,干燥固化;再清洗高温煅烧;降至室温,去除聚苯乙烯微球模板,留下有序的反蛋白石光子晶体微球;

(2) 反蛋白石光子晶体微球表面的修饰:将步骤(1)得到的反蛋白石光子晶体微球通过进行表面羟基化修饰,再对微球表面进行氨基修饰,最后对微球表面进行醛基修饰;

(3) 抗体的固定:通过化学键合方法将AFB₁-抗体固定于经过步骤(2)修饰得到的微球表面,得到修饰反蛋白石光子晶体微球。

2. 一种权利要求1所述的修饰反蛋白石光子晶体微球的制备方法,其特征在于,包括如下步骤:

(1) 反蛋白石光子晶体微球的制备:将二氧化硅和聚苯乙烯混合纳米乳液作为水相,将甲基硅油作为油相,使油相截断水相形成油包水型微球;将油包水型微球加热至水分蒸发完全,干燥固化;再清洗高温煅烧;降至室温,去除聚苯乙烯微球模板,留下有序的反蛋白石光子晶体微球;

(2) 反蛋白石光子晶体微球表面的修饰:将步骤(1)得到的反蛋白石光子晶体微球通过进行表面羟基化修饰,再对微球表面进行氨基修饰,最后对微球表面进行醛基修饰;

(3) 抗体的固定:通过化学键合方法将AFB₁-抗体固定于经过步骤(2)修饰得到的微球表面,得到修饰反蛋白石光子晶体微球。

3. 根据权利要求2所述的制备方法,其特征在于,步骤(2)所述羟基化修饰为将反蛋白石光子晶体置于食人鱼溶液,室温震荡;清洗后烘干,使微球表面修饰上羟基。

4. 根据权利要求2所述的制备方法,其特征在于,步骤(2)所述氨基修饰为将羟基化修饰的反蛋白石光子晶体置于含APTMS的甲苯溶液,震荡后清洗,使微球表面修饰上氨基。

5. 根据权利要求2所述的制备方法,其特征在于,步骤(2)所述醛基修饰为将氨基修饰的反蛋白石光子晶体置于戊二醛水溶液中,室温震荡,待微球由白色变为橘红色反应完毕,反应完毕清洗;使微球表面修饰上醛基。

6. 一种权利要求1所述的修饰反蛋白石光子晶体微球在富集、净化、检测AFB₁中的应用。

7. 根据权利要求6所述的应用,其特征在于,所述的修饰反蛋白石光子晶体微球在富集、净化、检测AFB₁标准品或者含AFB₁农产品样品中的应用。

8. 根据权利要求6或7所述的应用,其特征在于,所述富集过程为向修饰反蛋白石光子晶体微球加入不同浓度的AFB₁标准品或者含AFB₁农产品样品进行抗原抗体结合反应。

9. 根据权利要求7所述的应用,其特征在于,所述农产品样品为加入AFB₁甲醇溶液的农产品样品,包括大米、小麦或玉米。

10. 根据权利要求6或7所述的应用,其特征在于,所述净化、检测过程为将抗原抗体结合的修饰反蛋白石光子晶体微球用甲醇进行AFB₁洗脱,洗脱液吹干后进行衍生,衍生化后吹干,加入甲醇溶液,使用HPLC检测荧光值。

一种用于富集、净化、检测AFB₁的修饰反蛋白石光子晶体微球 及其制备方法和应用

技术领域

[0001] 本发明涉及对农产品中的AFB₁的富集和检测。具体涉及一种用于富集检测 AFB₁的修饰反蛋白石光子晶体微球及其制备方法和应用

背景技术

[0002] 农产品中的AFB₁(黄曲霉毒素)污染,成为影响食品安全,危害人们身体健康的巨型杀手。但长期以来,由于检测技术落后,制约着对农产品黄曲霉毒素污染的控制,也限制着我国农产品的出口。AFB₁是二氢呋喃氧杂萘邻酮的衍生物,含有一个双呋喃环和一个氧杂萘邻酮(香豆素)。AFB₁对哺乳动物毒性最大,会引起突变、致畸和肝损伤。黄曲霉毒素的检测有许多方法,主要方法有薄层色谱法、酶联免疫吸附测定法、高效液相色谱法和液相色谱-串联质谱法。黄曲霉毒素的检测通常采用HPLC,具有安全可靠、灵敏性好、准确度高、分辨率高等许多优点,被认为是最权威的检测黄曲霉毒素的方法,特别是反相高效液相色谱法。在HPLC检测黄曲霉毒素之前,样品需要进行前处理。前处理的方法通常采用免疫亲和柱净化样品。但是商业化的免疫亲和柱价格昂贵,同时装柱的过程复杂,填充材料为1mL柱容量一般在200ng。因此,开发一种价格相对低廉,减少装柱的过程,使得操作更简单,富集效果更好的富集净化黄曲霉毒素的材料具有重要意义。

发明内容

[0003] 发明目的:针对现有技术存在的问题,本发明通过一种用于富集、净化、检测AFB₁的修饰反蛋白石光子晶体微球,该修饰反蛋白石光子晶体微球可以有效地特异性富集、净化黄曲霉毒素。

[0004] 本发明的另一个目的是提供该用于富集、净化、检测AFB₁的修饰反蛋白石光子晶体微球的制备方法和应用。

[0005] 技术方案:为了实现上述目的,如本发明所述一种用于富集、净化、检测 AFB₁的修饰反蛋白石光子晶体微球,由反蛋白石光子晶体微球作为免疫亲和材料的载体,对微球进行羟基化修饰、氨基修饰和醛基修饰,再在微球表面修饰固定上AFB₁单克隆抗体。

[0006] 本发明所述的修饰反蛋白石光子晶体微球的制备方法,包括如下步骤:

[0007] (1)反蛋白石光子晶体微球的制备:将二氧化硅和聚苯乙烯混合纳米乳液作为水相,将甲基硅油作为油相,使油相截断水相形成油包水型微球;将油包水型微球加热至水分蒸发完全,干燥固化;再清洗高温煅烧;降至室温,去除聚苯乙烯微球模板,留下有序的反蛋白石光子晶体微球;

[0008] (2)反蛋白石光子晶体微球表面的修饰:将步骤(1)得到的反蛋白石光子晶体微球通过进行表面羟基化修饰,再对微球表面进行氨基修饰,最后对微球表面进行醛基修饰;

[0009] (3)抗体的固定:通过化学键合方法将AFB₁单克隆抗体固定于经过步骤 (2) 修饰得到的微球表面,得到修饰反蛋白石光子晶体微球。

[0010] 作为优选,步骤(2)所述羟基化修饰为将反蛋白石光子晶体置于食人鱼溶液,室温震荡;清洗后烘干,使微球表面修饰上羟基。优选食人鱼溶液(浓硫酸:双氧水(v:v)=7:3)中,按10uL/每微球,振荡反应。

[0011] 进一步地,步骤(2)所述氨基修饰为将羟基化修饰的反蛋白石光子晶体置于含APMS的甲苯溶液,震荡后清洗,使微球表面修饰上氨基。优选将微球放入含体积分数5%APMS的甲苯溶液中,按10uL/每微球,振荡反应。

[0012] 更进一步地,步骤(2)所述醛基修饰为将氨基修饰的反蛋白石光子晶体置于戊二醛水溶液中,室温震荡,待微球由白色变为橘红色反应完毕,反应完毕清洗;使微球表面修饰上醛基。优选体积分数2.5%戊二醛水溶液,按10uL/每微球,振荡反应。

[0013] 本发明所述的修饰反蛋白石光子晶体微球的富集、净化、检测AFB₁中的应用。

[0014] 进一步地,所述的修饰反蛋白石光子晶体微球的富集、净化、检测AFB₁标准品或者农作物样品中AFB₁的应用。

[0015] 其中,所述富集过程为向修饰反蛋白石光子晶体微球加入不同浓度的AFB₁标准品或者含AFB₁农作物样品进行抗原抗体结合反应。

[0016] 进一步地,所述农产品样品为加入AFB₁甲醇溶液的农产品样品,包括大米、小麦和玉米。

[0017] 进一步地,所述净化、检测过程为将抗原抗体结合的修饰反蛋白石光子晶体微球用甲醇进行AFB₁洗脱,洗脱液吹干后进行衍生,衍生化后吹干,加入甲醇溶液,使用HPLC检测。

[0018] 本发明的原理如图1所示,在粒径大小相同的反蛋白石光子晶体微球表面用食人鱼(双氧水:浓硫酸为3:7v/v)溶液进行羟基化修饰,用含APTES甲苯溶液(5%APTESv/v)对微球表面进行氨基修饰,再用体积分数2.5%戊二醛水溶液对微球表面修饰醛基,固定AFB₁-抗体,富集AFB₁,使用纯甲醇洗脱液将AFB₁进行洗脱,柱前衍生化后通过HPLC进行检测,建立标准曲线。

[0019] 本发明使用修饰反蛋白石光子晶体微球免疫亲和-HPLC富集、净化和检测AFB₁的应用方法,是采用反蛋白石光子晶体微球为免疫亲和载体,在微球表面修饰AFB₁-抗体,以AFB₁为检测对象,通过抗体抗原特异性结合富集AFB₁,纯甲醇洗脱液净化AFB₁,柱前衍生化后通过HPLC检测检荧光值。

[0020] 有益效果:与现有技术相比,本发明具有如下优点:

[0021] 本发明制备得到的修饰反蛋白石光子晶体微球可以有效地特异性富集、净化黄曲霉毒素;使用30uL修饰反蛋白石光子晶体微球作为免疫亲和材料,能够富集AFB₁量最多达到50ng,标品的洗脱率能达到90%;同时本发明的制备方法简单方便,原料价格低廉,节约成本。通过该修饰反蛋白石光子晶体微球用于富集、净化、检测农产品中的AFB₁的方法富集毒素的效果好,净化洗脱率高,检测准确;同时能够节约装填柱子的过程,使得操作更简易方便。

附图说明

[0022] 图1为反蛋白石光子晶体微球免疫亲和-HPLC检测AFB₁原理图;

[0023] 图2为实施例2检测AFB₁标准曲线关系图;

- [0024] 图3为实施例2中AFB₁富集洗脱量与标品对比关系图；
[0025] 图4为实施例2中AFB₁洗脱率关系图。

具体实施方式

- [0026] 以下结合附图和实施例对本发明作进一步说明。
- [0027] 本发明所用AFB₁、AFB₁单克隆抗体、戊二醛、APTES购于Sigma-Aldrich。甲基硅油购于宇诺公司。无水乙醇、浓硫酸、化学纯甲醇、正己烷购于南京化学试剂公司。甲苯购于中国联式化工试剂有限公司(上海)。色谱级甲醇购于德国默克公司。三氟乙酸购于北京百灵威科技有限公司。谷物包括大米、玉米和小麦购于南京苏果超市。
- [0028] 本发明所用的仪器主要有：
- [0029] KQ-300B型超声波清洗器昆山市超声仪器有限公司
- [0030] JSM-5610LV型扫描电子显微镜日本日立公司
- [0031] DHG-9140型电热恒温鼓风干燥箱上海精宏实验设备有限公司
- [0032] OTL1200管式炉南京南大仪器厂
- [0033] LSP01-1A微流注射泵河北保定兰格恒流泵有限公司
- [0034] ZQTY-70-T型震荡培养箱上海知楚仪器有限公司摇床
- [0035] FW177型中药粉碎机长沙市常宏制药机械设备厂
- [0036] QL-866型漩涡混合仪海门麒麟医用仪器厂
- [0037] MJ33型金相显微镜广州明美光电技术有限公司
- [0038] USB2000+光纤光谱仪蔚海光学仪器(上海)有限公司
- [0039] TS-1000型脱色摇床海门其林贝尔仪器制造有限公司
- [0040] Agilent 1100型高效液相色谱仪美国Agilent公司
- [0041] HH-S2型恒温水浴锅金坛市医疗仪器厂
- [0042] 单分散二氧化硅纳米颗粒的制备：采用改进Stöber法合成。
- [0043] 实施例1
- [0044] (1) 反蛋白石光子晶体微球的制备：将装有18%mg/mL二氧化硅(20nm) 和9.4%mg/mL聚苯乙烯(280nm) 混合纳米乳液的注射器作为水相，将装有纯甲基硅油的注射器作为油相，注射器连接微流注射泵，注射器针头连接三通管，控制流速(二氧化硅、聚苯乙烯乳液流速14ml/h, 油相12ml/h)，使油相截断水相形成合适大小的油包水型微球。
- [0045] 将截断形成的油包水型微球置于装有甲基硅油的接收器中，放在60℃下加热至水分蒸发完全，微球内部纳米颗粒进行自组装，当微球变成固态即干燥固化完成。将多余的甲基硅油回收，接收器上残留的甲基硅油和固态微球通过正己烷反复清洗，所有的微球集中收集在坩埚中，分别用正己烷、无水乙醇各洗三遍，待坩埚中的无水乙醇挥发干之后，转移至管式炉中，温度以4℃/min缓慢增加至 500℃高温煅烧8小时，以4℃/min缓慢降至室温，去除聚苯乙烯微球模板，留下有序的反蛋白石光子晶体微球。
- [0046] (2) 反蛋白石光子晶体微球表面的修饰：步骤(1)得到粒径大小相同的反蛋白石光子晶体微球通过食人鱼溶液(浓硫酸：双氧水(v:v)=7:3)按10uL/每微球，室温震荡，清洗后烘干，使微球表面修饰上羟基，再用含体积分数为5%APTES 的甲苯溶液按10uL/每微球，室温震荡，清洗后烘干，对微球表面进行氨基修饰，之后用体积分数2.5%戊二醛水溶液按

10uL/每微球,室温震荡,待微球由白色变为橘红色反应完毕,反应完毕清洗,使微球表面修饰上醛基。

[0047] (3) 抗体的固定:通过化学键合方法将AFB₁单克隆抗体固定于经过步骤 (2) 表面修饰好醛基的反蛋白石光子晶体微球表面,取30uL修饰好醛基的反蛋白石光子晶体微球直接加入500uL,86uL/mL的AFB₁-抗体进行偶联,在4℃下震荡过夜,用pH7.4磷酸盐缓冲液洗去没有偶联的抗体;得到修饰反蛋白石光子晶体微球。

[0048] 实施例2

[0049] 标准品AFB₁富集净化检测:

[0050] 将实施例1制备的修饰反蛋白石光子晶体微球,置于离心管中,每管30uL,取5管分别加入浓度为500ng/mL、200ng/mL、100ng/mL、10ng/mL、5ng/mL的AFB₁标准溶液进行抗原抗体结合反应,37℃震荡1h。结合1h之后,PBS溶液 (pH7.4) 洗三次。之后用800uL的甲醇分四次10min室温震荡洗脱,将洗脱液收集分别放置在5mL的玻璃试剂瓶内,放置在50℃水浴锅内氮气流吹干。分别加入300uL的三氟乙酸衍生试剂进行衍生,在室温下衍生3min。衍生化后置于 50℃水浴锅内氮气流吹干。吹干后加入200uL甲醇溶液(经过220nm滤头过滤) 溶解,之后使用HPLC检测,HPLC条件为:色谱柱:反相C18Agilent XDB, 4.6mm×250mm,粒径5μm;柱温:30℃;流动相:甲醇:水=45:55;激发波长: 365nm;发射波长:435nm;相对湿度:40%;进样量:20uL;流速:1.0ml/min。标曲绘制见图2。

[0051] 实施例2中洗脱剂最优浓度为100%甲醇溶液,洗脱剂体积最优为800uL, 30uL的修饰反蛋白石光子晶体微球最多可以结合50ng的AFB₁,洗脱率能达到 90%左右,富集效果见图3,洗脱率见图4。由图3和图4可以看出本发明制备的修饰反蛋白石光子晶体微球只需要很少的量30uL就可以结合50ng的AFB₁,相比于现有技术中的免疫亲和柱净化样品1mL柱容量一般在200ng,具有明显的优势,同时洗脱率能达到90%左右,说明本发明制备的可以有效地特异性富集、净化黄曲霉毒素,并且可以有效洗脱进行下一步检测。

[0052] 实施例3

[0053] 谷物试样的处理:

[0054] 选择大米、小麦、玉米三种农产品样品进行AFB₁的加标回收率实验。从市场购买三种样品,使用粉碎机进行磨碎,过20目筛。准确称取5.0g样品,每种样品称取三份,置于125mL具塞锥形瓶内,配制1000ng/mL的AFB₁甲醇溶液,分别向样品中加入0.25mL、1.25mL、2.5mLAFB₁甲醇溶液。晃动使样品与AFB₁毒素混匀,置于通风处中将甲醇挥发干。将挥发干的样品各加入1g氯化钠和 25mL样品提取液(甲醇:水=80:20),混匀后置于均质机均质1min,均质后室温下往复震荡提取30min.Whatman4定性滤纸过滤,准确取10mL滤液过450nm 滤头,收集滤液待用,滤液为浓度10、50、100ng/mL的AFB₁加标农产品。

[0055] 实施例4

[0056] 将实施例1制备的修饰反蛋白石光子晶体微球,置于离心管中,每管30uL,每管分别加入200uL实施例3浓度为10、50、100ng/mL的AFB₁加标农产品滤液进行结合反应,37℃震荡1h。结合1h之后,PBS溶液 (pH7.4) 洗三次。之后用800uL的甲醇分四次10min室温震荡洗脱。将洗脱液放置在5mL的玻璃试剂瓶内,放置在50℃水浴锅内氮气流吹干。分别加入300uL的三氟乙酸衍生试剂进行衍生,在室温下衍生3min。衍生化后置于 50℃水浴锅内氮气流吹干。吹干后加入200uL甲醇溶液(经过220nm滤头过滤) 溶解,之后使用HPLC检测荧光值,并计

算加标回收率, HPLC条件为色谱柱: 反相C18Agilent XDB, 4.6mm×250mm, 粒径5μm; 柱温: 30℃; 流动相: 甲醇: 水=45:55; 激发波长: 365nm; 发射波长: 435nm; 相对湿度: 40%; 进样量: 20μL; 流速: 1.0ml/min。检测结果见表1。

[0057] 表1农产品中的AFB₁检测

农产品	加标毒素 (ng/mL)	反蛋白石光子晶体微球
		回收率%
大米	10	70.00±7.07
	50	85.15±7.58
	100	76.73±5.36
[0058]	10	75.00±6.59
	50	88.21±2.31
	100	85.15±5.44
玉米	10	109.40±5.73
	50	92.05±2.89
	100	88.21±3.07

[0059] 由表1可知, 将本发明修饰反蛋白石光子晶体微球作为免疫亲和材料去富集加标农产品中的AFB₁, 衍生化后HPLC检测加标回收率, 得出大米、小麦、玉米加标的回收率分别为70.00±7.07~85.15±7.58%, 75.00±6.59~88.21±2.31%, 88.21±3.07~109.4±5.73%, 说明本发明制备的修饰反蛋白石光子晶体微球可以有效地富集、净化、检测农产品中的AFB₁, 富集毒素的效果好, 同时能够节约装填柱子的过程, 使得操作更简易方便。

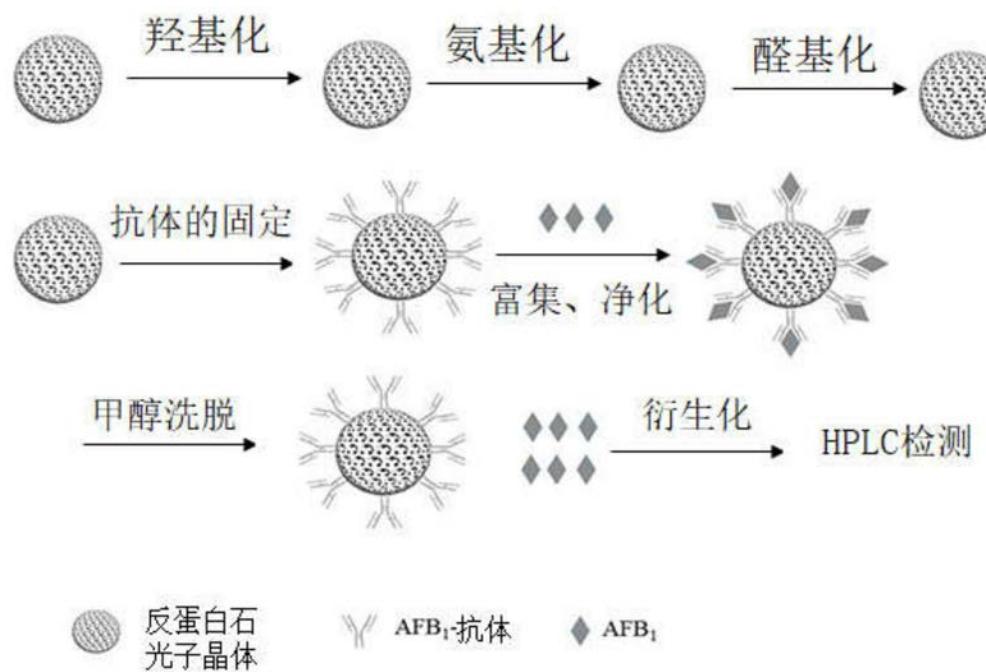


图1

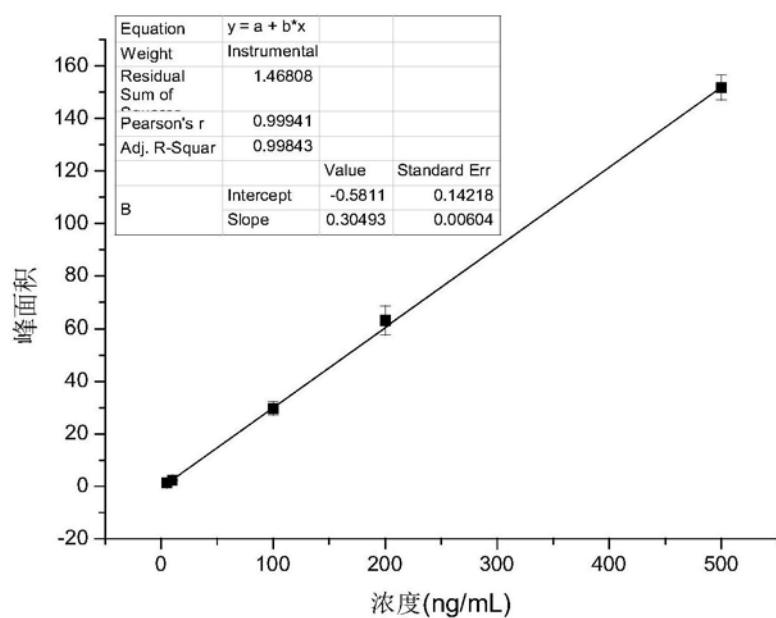


图2

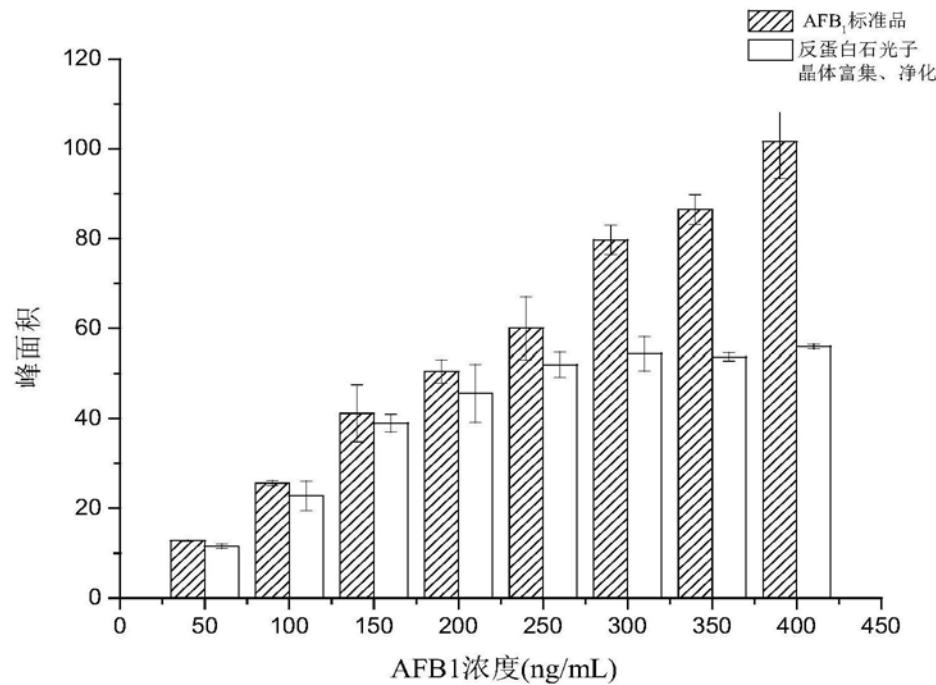


图3

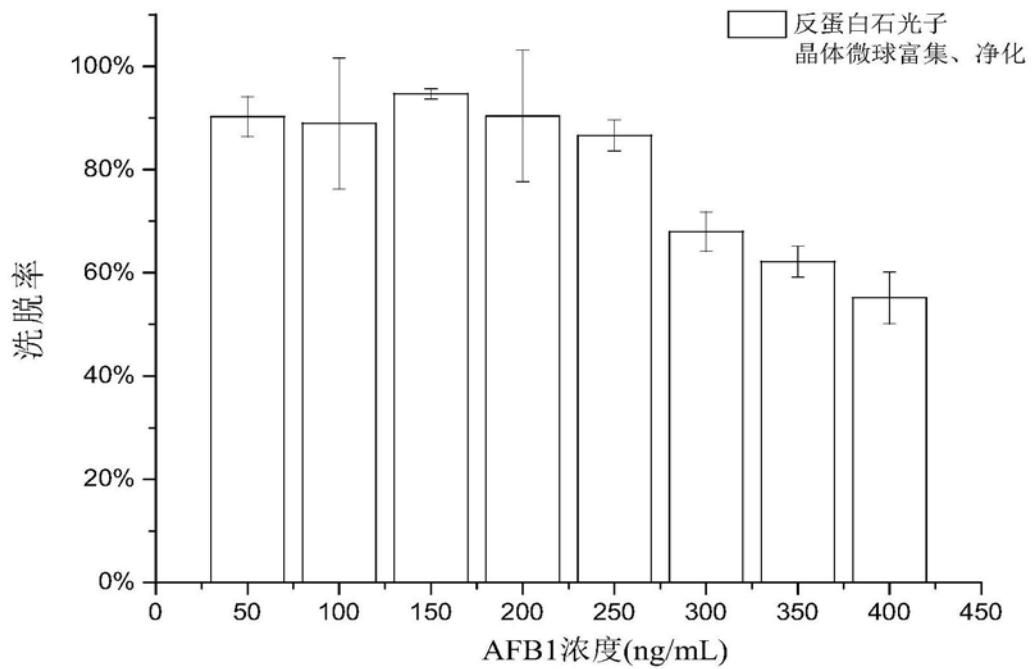


图4

专利名称(译)	一种用于富集、净化、检测AFB1的修饰反蛋白石光子晶体微球及其制备方法和应用		
公开(公告)号	CN107505419B	公开(公告)日	2020-05-19
申请号	CN201710654982.X	申请日	2017-08-03
[标]申请(专利权)人(译)	南京师范大学		
申请(专利权)人(译)	南京师范大学		
当前申请(专利权)人(译)	南京师范大学		
[标]发明人	李建林 郑茜 李玮 郑铁松 金岩昊 李奕辰 李亚维 马六十 刘妍 丁志 邓杨 朱瑞雪 蔡婷婷		
发明人	李建林 郑茜 李玮 郑铁松 金岩昊 李奕辰 李亚维 马六十 刘妍 丁志 邓杨 朱瑞雪 蔡婷婷		
IPC分类号	G01N30/06 G01N30/02 G01N33/577 G01N33/543 G01N33/531		
CPC分类号	G01N30/02 G01N30/06 G01N33/531 G01N33/54313 G01N33/577 G01N2333/38		
代理人(译)	孙斌		
其他公开文献	CN107505419A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种用于富集、净化、检测AFB1的修饰反蛋白石光子晶体微球及其制备方法和应用；该修饰反蛋白石光子晶体微球可以有效地特异性富集、净化黄曲霉毒素；使用30ul修饰反蛋白石光子晶体微球作为免疫亲和材料，能够富集AFB1量最多达到50ng，标品的洗脱率能达到90%；同时本发明的制备方法简单方便，原料价格低廉，节约成本。通过该修饰反蛋白石光子晶体微球用于富集、净化、检测农产品中的AFB1的方法富集毒素的效果好，同时能够节约装填柱子的过程，使得操作更简易方便。

农产品	加标毒素 (ng/mL)	反蛋白石光子晶体微球
		回收率%
大米	10	70.00±7.07
	50	85.15±7.58
	100	76.73±5.36
小麦	10	75.00±6.59
	50	88.21±2.31
	100	85.15±5.44
玉米	10	109.40±5.73
	50	92.05±2.89
	100	88.21±3.07