

基于量子点荧光猝灭法的蛋白质检测芯片

彭嫚^{1,3}, 白忠臣², 张莹², 黎显继², 张正平^{2*}

¹ 贵州大学大数据与信息工程学院, 贵州 贵阳 550025;

² 贵州大学贵州省光电子技术及应用重点实验室, 贵州 贵阳 550025;

³ 贵州师范大学机械与电气工程学院, 贵州 贵阳 550025

摘要 基于羧基量子点的荧光猝灭效应, 提出了一种检测神经生长因子(NGF)的新方法。研究表明, 在 pH7.5 的缓冲溶液中, NGF 抗原与羧基量子点标记的 NGF 抗体发生特异性结合, 能使羧基量子点的荧光发生猝灭。在 1~20 ng·mL⁻¹ 范围内, 荧光猝灭程度与 NGF 抗原质量浓度呈良好的线性关系, 线性系数为 0.9696, 检测下限为 1 ng·mL⁻¹。所提检测方法具有良好的抗干扰特性, 在诊断检测方面具有巨大的应用潜力。

关键词 激光技术; 羧基量子点; 荧光猝灭法; 神经生长因子; 抗原; 抗体

中图分类号 O432

文献标识码 A

doi: 10.3788/LOP56.062601

Protein Detection Chip Based on Quantum Dot Fluorescence Quenching Method

Peng Man^{1,3}, Bai Zhongchen², Zhang Ying², Li Xianji², Zhang Zhengping^{2*}

¹ College of Big Data and Information Engineering, Guizhou University, Guiyang, Guizhou 550025, China;

² Key Laboratory for Photoelectronics and Application Technology, Guizhou University, Guiyang, Guizhou 550025, China;

³ School of Mechanical & Electrical Engineering, Guizhou Normal University, Guiyang, Guizhou 550025, China

Abstract A new method for detecting the nerve growth factors (NGF) is proposed based on the fluorescence quenching effect of carboxyl quantum dots. The research results show that in the pH7.5 buffer solution, the NGF antigen specifically binds to the carboxyl quantum dot-labeled NGF antibody, which can quench the fluorescence of the carboxyl quantum dots. The fluorescence quenching degree and the NGF antigen mass concentration has a good linear relationship in the range of 1-20 ng/mL, and the linear correlation coefficient is 0.9696 with the detection limit of 1 ng/mL. This proposed method has good anti-interference characteristics and has great potential applications in diagnosis and detection.

Key words laser technique; carboxyl quantum dots; fluorescence quenching method; nerve growth factor; antigen; antibody

OCIS codes 260.2510; 170.1610; 300.2530

1 引言

科学研究发现, 在人体出现疾病的不同阶段, 甚至在人体还没有感知到任何症状的疾病早期, 人体液中神经生长因子(NGF)的水平早已发生了改变, 从而进一步影响组织、器官和有机体的功能, 因

此快速有效地检测人体液内的 NGF, 对疾病的预防、诊断及后期治疗意义重大^[1-6]。在这样的背景下, 随着纳米技术^[7-10]、生物技术^[11-13]、制造技术^[14-17]等先进技术的发展, 蛋白质芯片检测技术应运而生。

蛋白质芯片具有检测速度快、成本低等许多其

收稿日期: 2018-08-15; 修回日期: 2018-09-05; 录用日期: 2018-09-30

基金项目: 国家自然科学基金(11204046)、国家国际科技合作专项项目(2014DFA00670)、中央引导地方科技发展专项(QKZYD[2017]4004)、贵州省科技支撑项目(QKHZ[2017]2887)

* E-mail: pengman1001@163.com

他方法难以比拟的优点,是国际科技前沿热点问题之一^[18]。研发蛋白质芯片以及由此衍生的生物分子识别专家系统和疾病诊断系统等已经成为生物科学和生物医学等领域的迫切需要。截止目前,蛋白质生物芯片技术已经取得一定进展。1990年瑞典PHARMACIA公司开发了基于SPR技术的生物分子芯片技术,在此研究工作的基础上,随后成功地发展了商业化的SPR生物传感器产品^[19]。20世纪90年代中期美国Luminex公司开发的悬浮阵列生物芯片,这种技术已被成功应用于核酸和蛋白质等快速检测领域^[20-21]。美国CIPHERGEN公司发展了表面增强激光解吸电离(SELDI)质谱技术^[22],将序列式芯片技术与质谱技术相结合,提出一种可对复杂的多种生物分子混合样品进行质谱分析的方法。目前,市场上的商用产品主要有瑞典Biacore AB公司的Biacore3000系列产品,美国Affinity Sensors公司的Iasys system系列产品,日本Nippon Laser Electronics公司的SpR-670以及德国Biotul AG系列产品。在国内,中国科学院电子学研究所开发了SPR-2000^[23],中国科学院力学研究所历经十年研发了准商用的椭偏成像技术蛋白质芯片生物传感器^[24]。这些商业设备的主要缺点是体积大、价格高、构造复杂,不利于商业化普及。

本文选用廉价易得的玻璃作为基底,通过硅烷偶联剂(APTES)改性玻璃表面将量子点(QD)与NGF抗体连接制成阵列式蛋白质芯片。同时,利用NGF抗原对蛋白质芯片的猝灭特性^[25],建立了检测NGF抗原的方法,用于NGF抗原质量浓度的检测。

2 实验

2.1 仪器与材料

实验仪器包括:原子力显微镜(AFM)(型号:CSPM5500,北京本原纳米公司,中国),傅里叶红外光谱仪(FTIR)(型号:V70,Bruker,德国);荧光光谱仪(型号:QE6500,Ocean optics,美国);真空干燥箱(型号:DZF-6020,上海博讯实业有限公司,中国);水浴恒温振荡器(SHA-CA,常州润华电器有限公司,中国)。

实验材料包括:表面包覆聚丙烯酸的硒化镉/硫化锌(CdSe/ZnS)包壳水溶性羧基量子点;NGF抗原;NGF抗体;浓硫酸;过氧化氢;硅烷偶联剂(APTES)硅烷试剂;磷酸盐缓冲液(PBS);水溶性缩合剂1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐(EDC);N-羧基硫代琥珀酰亚胺(Sulfo-NHS)

活化剂。所用试剂均为分析纯,实验用水为去离子水。

2.2 玻璃片的改性

1) 清洗玻璃基片。把6 mL的浓硫酸(H_2SO_4)与1.5 L的(过氧化氢) H_2O_2 以体积比4:1混合(俗称食人鱼洗液);将玻璃片完全浸泡在前期配置的溶液中,并整体放于水浴恒温箱中,温度设为80℃,浸泡20~30 min;取出玻璃片,用去离子水反复冲洗,目的是把玻璃片上过剩的混合液冲洗掉;将玻璃片放在干燥箱中以120℃烘干。

2) 偶联氨基。制备0.72 mL的硅烷偶联剂(APTES)与5 mL无水乙醇的混合溶液,再滴入冰乙酸,目的是为了调节混合溶液的pH值,使其接近于量子点的pH值。接着,将清洗好的玻璃片完全浸泡在此溶液中,放在温度为50℃的水浴恒温振荡箱中,反应时间为5 h。取出玻璃片,用无水乙醇反复冲洗3次后,再用去离子水冲洗。冲洗完成后放入真空干燥箱,120℃真空干燥2 h,即完成生物芯片表面氨基的修饰。最后,将该过程制备好的生物芯片放入4℃冰箱中保存备用。

2.3 活化羧基量子点

离心管中依次加入100 μ L量子点、30 μ L N-羧基硫代琥珀酰亚胺(Sulfo-NHS) ($20 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)和30 μ L水溶性缩合剂1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐(EDC) ($4 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$),用PBS (pH7.4)定容至1 mL;避光反应20 min;8000 r/min离心取沉淀,用PBS (pH 7.4)洗涤2次,最后分散在1 mL PBS中,得到活化羧基的量子点。活化后的量子点可与玻璃片的氨基反应形成酰胺键,使量子点偶联到玻璃片表面。

2.4 在玻璃片上偶联羧基量子点及抗原抗体

把前期修饰了氨基的玻璃片从冰箱中取出,把活化后的量子点利用自制的机械手在玻璃片上进行点样,阵列中每个点的距离为0.05 μ m,阵列行数列为12。用气泵控制每点的量。阵列点样完成后加入5 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的抗体,抗体的氨基和水溶性量子点上的羧基会缩合成键,将抗体固定到量子点上。用搭建的检测系统检测每点荧光,记录。再加入已知的不同质量浓度的抗原逐点加样,通过抗原抗体特异性反应将抗原检测出来。检测每点荧光,记录。

2.5 蛋白质芯片检测

蛋白质抗原的检测利用了抗原抗体的特异性结合,影响了量子点表面的性质,从而使量子点荧光发生变化。图1为蛋白质芯片检测原理,如图1(a)所

示。先把纳米量子点团簇固定于基底,在量子点上固定抗体(Antibody),制成检测芯片。在检测芯片上滴入被测样品,当被检测样品中含有与抗体对应的抗原(Antigen)时,纳米量子点受激发光。由于纳米量子点的各向异性对激发光产生调制效应,以及量子点的随机分布使激发光在小角度范围内发生混沌,激发光发生偏转,如图1(b)所示,而这个偏转程度直接反映了抗原(抗体)结合的程度,是判断抗原-抗体结合、消除假阳性的判断指标。而光学混沌的发生,导致荧光被充分激发,产生最大的荧光强度。

纳米量子点蛋白质芯片配套检测系统示意图和样机实物图如图2所示。在图中,微机电(MEMS)微镜进行阵列化扫描,其扫描的激光投射到阵列化的纳米量子点蛋白质芯片的背面;阵列化的量子点受激辐射荧光和散射激发激光;荧光和散射光均被

一透镜接收;通过一双向分色镜后,荧光通过双向分色镜向前传播,经过一可旋转的偏振片,再由自由光路耦合进光纤后达到光纤光谱仪;散射光被双向分色镜所反射,进入光学共焦系统后进入电子目镜(CCD)而成像。

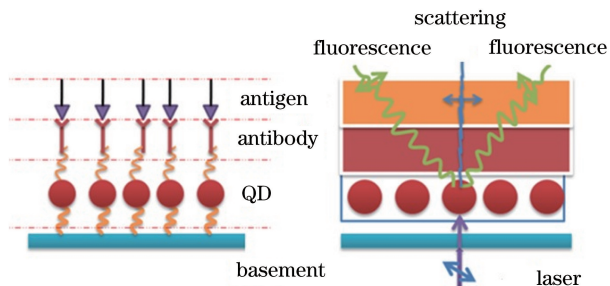


图1 蛋白质芯片检测原理。(a)芯片结构;(b)检测原理
Fig. 1 Principle of protein-chip detection.
(a) Chip structure; (b) detection principle

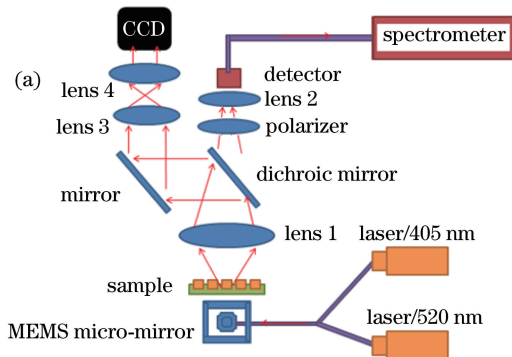


图2 实验装置。(a)示意图;(b)样机图片

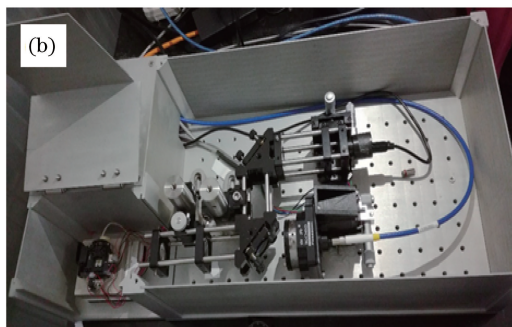


Fig. 2 Experimental setup. (a) Block diagram; (b) prototype photo

3 结果与讨论

3.1 玻璃片的表面性质分析

图3为玻璃片改性前(a)和改性后(b)的AFM图。图3(a)为干净的玻璃基底的表面,由图可知玻璃本身表面粗糙,凸起最高为5.87 nm。图3(b)为经过硅烷偶联剂处理之后的玻璃基底表面,在图3(b)中可观察到直径为20~30 nm的圆饼形凸起密集分布于玻璃基底之上,凸起最高约30 nm,无裂纹,但有一定的表面粗糙度,这对增大比表面积和提高探针固定率意义重大。表面处理主要是对玻璃表面形态(以粗糙度为参数,形貌)产生影响,而其表面形态的改变将直接影响后续芯片制作过程中量子点的连接。分析认为,玻璃片改性后相对改性前高度增加和形貌变化的原因是玻璃片生长了氨基薄膜。玻璃片表面衍生出的具有化学活性的功能团氨基为后续羧基量子点的固定奠定了基础。

图4为经硅烷偶联剂(APTES)修饰的玻璃片的傅里叶红外光谱。图中 3400 cm^{-1} 附近中等强度的吸收峰主要来源于N—H键的伸缩振动, 1650 cm^{-1} 处为伯氨— NH_2 变角振动频率,吸收强度中等^[26]。 1100 cm^{-1} 处的宽强谱带则是由伯氨基C—N键($1220\sim 1020\text{ cm}^{-1}$)和C—O键($1100\sim 1050\text{ cm}^{-1}$)的伸缩振动吸收相重叠形成的。 980 cm^{-1} 处的吸收峰是亚甲基中C—H键的伸缩振动峰, 800 cm^{-1} 和 475 cm^{-1} 附近的吸收峰是Si—O—C的对称与不对称伸缩振动吸收峰,这表明氨基丙基三甲氧基硅烷通过Si—O—C键与玻璃基底表面形成了共价交联,且在三碳链的末端余有游离的伯氨基^[26]。综合形貌及傅里叶红外光谱分析表明氨基薄膜已经在玻璃片上生长。在基底上固定纳米量子点时需保证在芯片上以阵列法生长,能够与量子点表面羧基结合的化学键是吸附空位。以上结果也表明改性后的玻璃片已为后续量子点的固定搭建好了平台。

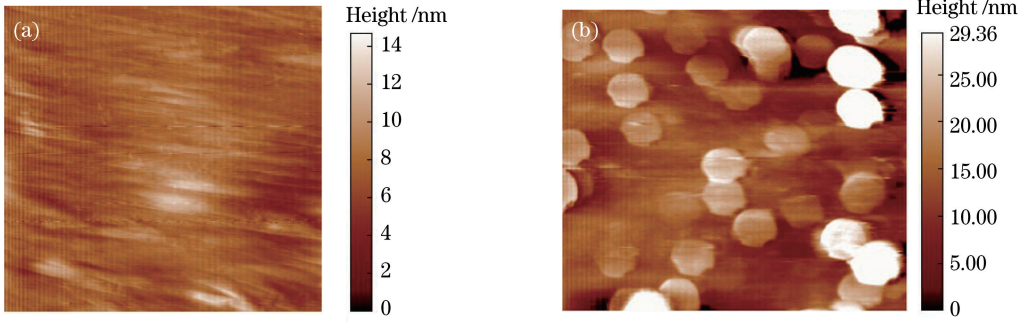


图3 玻璃片的AFM图。(a)改性前;(b)改性后

Fig. 3 AFM of glass substrate. (a) Unmodified; (b) modified

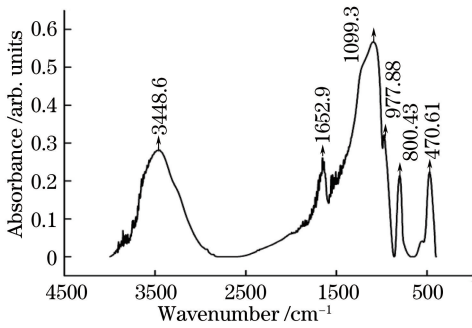


图4 经硅烷偶联剂(APTES)修饰的玻璃片的傅里叶红外光谱

Fig. 4 Infrared Fourier transform spectrum of glass substrate modified by APTES

3.2 量子点-抗原-抗体的固定效果分析

图5为纳米量子点生物芯片阵列。同时且实时地采集荧光和散射光的偏振变化,一个用于判断抗原与抗体的结合程度,另一个用于检测抗体(抗原)的含量。图5(a)为项目小组制作的阵列化的纳米量子点芯片表面,图5(b)为纳米量子点阵列受405 nm激光激发下的激辐射荧光的照片。图5(a)和(b)的插图分别为阵列单元照片和对应的荧光图片,单元直径为315 μm。

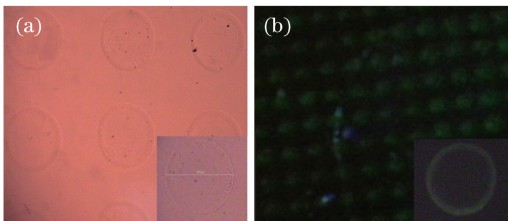


图5 纳米量子点生物芯片阵列。(a)表面,插图为阵列单元照片;(b)荧光,插图为荧光图片

Fig. 5 Nanometer quantum dot biochip array. (a) Surface, the inset is an array unit photo; (b) fluorescence, the inset is a fluorescent image

图6为纳米量子点生物芯片阵列单元照片,放大倍数为200倍。由图可以看到,量子点在单元中是分散的。将照明汞灯换成405 nm激光,激发整个单元,利用基于MEMS微镜集成的纳米量子点检测样机测量芯片上的不同检测单元,发现不同检测单元散射消光偏振角 θ (相对抗体而言,图6最右一列)发生了变化,此时的荧光光谱的荧光如图6(g)~(i)所示。从图中可以看出,随着偏转角的变化,所测量荧光强度有明显的变化,即偏转角变大检测抗体的荧光强度变弱,抗原结合密度增加,这也说明偏振度大识别抗原结合程度强,结合的抗原相对较多。由于芯片阵列中不同单元之间的结合程度是有差异的,因此需区别对待有利于提高检测结果的精确度。

3.3 生物芯片对不同质量浓度NGF抗原的检测

针对不同单元采用分类处理的方法,测量了不同质量浓度的NGF抗原与光谱仪检测峰值强度的关系。抗体的偶联是利用量子点上的羧基和抗体上的氨基缩合成键连接到玻璃片上的。抗原检测是基于抗原抗体的特异性结合影响量子点表面的性质,从而使量子点荧光发生变化来实现的。

实验测量的抗原的质量浓度(Ag-V)与加入一定质量浓度抗原后的荧光猝灭程度(FQD)如表1所示。

图7为NGF质量浓度与荧光峰值强度间的关系。随着NGF质量浓度的增大,生物芯片的荧光强度也逐渐减弱,生物芯片的荧光猝灭程度 I 与NGF经过校对,此处抗体应更改为抗原质量浓度 C 在 $1 \sim 20 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 范围内呈良好的线性关系,回归方程为 $I = 16.081C(\text{NGF}) + 9.9537$,相关系数 $R^2 = 0.9696$,检出限为 $1 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

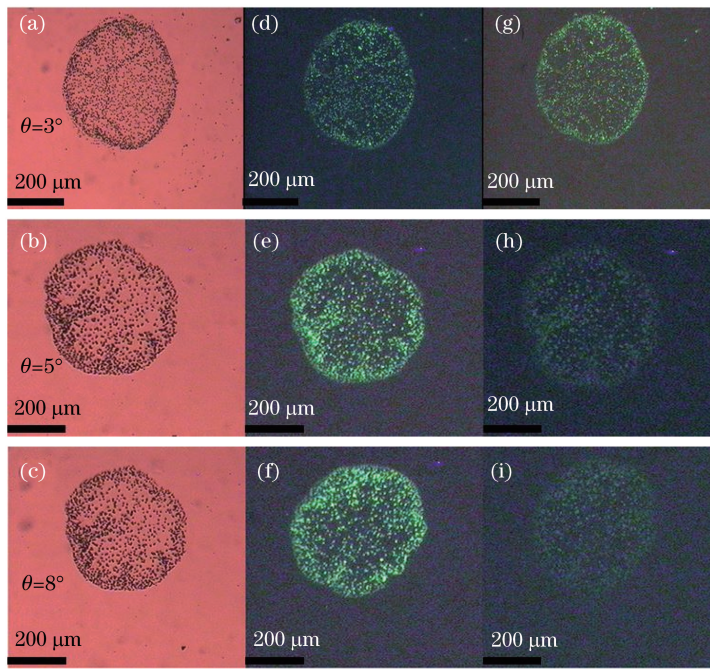


图 6 纳米量子点生物芯片阵列单元。

(a)~(c)照片;(d)~(f)结合抗体后的荧光图片;(g)~(i)在抗体基底上再结合抗原的荧光图片

Fig. 6 Nanometer quantum dot biochip array unit. (a)-(c) Photos; (d)-(f) fluorescent images after binding antibodies; (g)-(i) fluorescent images after binding antigens on antibody substrate

表 1 不同抗原质量浓度下的荧光猝灭程度

Table 1 Fluorescence quenching degrees under different antigen concentrations

No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Concentration of Ag-V / (ng·mL ⁻¹)	0.1	0.2	0.5	1.0	2.5	5.0	7.5	10.0	12.5	17.5	20.0	50.0	100.0
FQD /arb. units	6.5	2.65	17.77	3.85	45.68	126.68	143.76	158.16	205.68	273.72	344.28	447.84	454.72

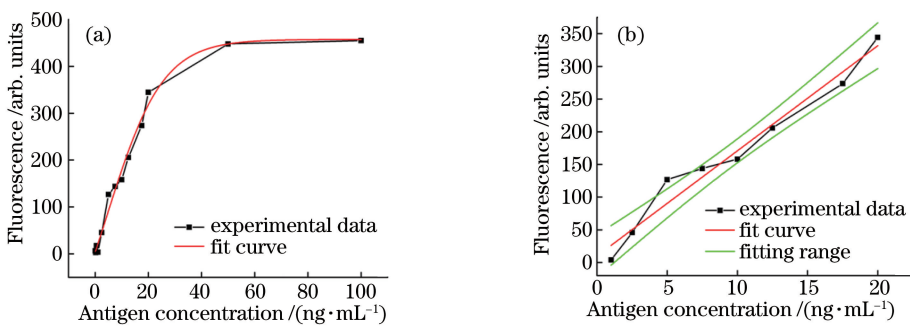


图 7 NGF 质量浓度与荧光峰值强度间的关系。(a) 0~100 ng·mL⁻¹; (b) 局部放大图

Fig. 7 Relationship between NGF concentration and fluorescence peak intensity. (a) 0-100 ng·mL⁻¹; (b) partial enlargement

4 结 论

建立了一种基于荧光猝灭法检测 NGF 抗原的生物芯片,这种芯片可通过荧光偏振判断 NGF 抗原和抗体连接的效果,同时可定量检测 NGF 抗原的质量浓度。在加入抗原时,芯片阵列中每个单元的荧光均发生肉眼可见的强度变化,与此同时荧光

光谱仪记录荧光。该方法操作简单,需要样品量少,特异性强,灵敏度较高,检出限度低至 1 ng·mL⁻¹。

参 考 文 献

[1] Hayakawa Y, Sakitani K, Konishi M, *et al.* Nerve growth factor promotes gastric tumorigenesis through aberrant cholinergic signaling[J]. *Cancer Cell*, 2017,

- 31(1): 21-34.
- [2] Colangelo A M, Bianco M R, Vitagliano L, *et al.* A new nerve growth factor-mimetic peptide active on neuropathic pain in rats[J]. *Journal of Neuroscience*, 2008, 28(11): 2698-2709.
- [3] Coskun S, Varol S, Ozdemir H H, *et al.* Association of brain-derived neurotrophic factor and nerve growth factor gene polymorphisms with susceptibility to migraine [J]. *Neuropsychiatric Disease & Treatment*, 2016, 12(1): 1779-1785.
- [4] Aloe L, Rocco M L, Balzamino B O, *et al.* Nerve growth factor: Role in growth, differentiation and controlling cancer cell development [J]. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 2016, 35: 116-122.
- [5] Bonini S, Lambiase A, Rama P, *et al.* Phase I trial of recombinant human nerve growth factor for neurotrophic keratitis [J]. *Ophthalmology*, 2018, 125(9): 1468-1471.
- [6] Ketschek A, Jones S, Spillane M, *et al.* Nerve growth factor promotes reorganization of the axonal microtubule array at sites of axon collateral branching [J]. *Developmental Neurobiology*, 2015, 75(12): 1441-1461.
- [7] Medina-Sánchez M, Miserere S, Merkoçi A. Nanomaterials and lab-on-a-chip technologies[J]. *Lab on a Chip*, 2012, 12(11): 1932-1943.
- [8] Peng M, Bai Z C, Li X J, *et al.* Controlling wide-spectrum fluorescence on Au/ZnSe multi-heterojunction [J]. *Applied Physics A*, 2018, 124(7): 480.
- [9] Bai Z C, Huang Z L, Hao L C, *et al.* Identifying defects in thin film of high power laser lens by using near field microimaging method[J]. *Chinese Journal of Lasers*, 2017, 44(1): 0103001.
白忠臣, 黄兆岭, 郝礼才, 等. 近场显微成像法识别高功率激光镜片薄膜内部缺陷[J]. *中国激光*, 2017, 44(1): 0103001.
- [10] Chen W B, Ma H, Ye J X, *et al.* Research progress on quantum dot light emitting diodes [J]. *Laser & Optoelectronics Progress*, 2017, 54(11): 110003.
陈雯柏, 马航, 叶继兴, 等. 量子点发光二极管的研究进展[J]. *激光与光电子学进展*, 2017, 54(11): 110003.
- [11] Jamieson T, Bakhshi R, Petrova D, *et al.* Biological applications of quantum dots[J]. *Biomaterials*, 2007, 28(31): 4717-4732.
- [12] Zhao F, Kim J. Fabrication of a dopamine sensor based on carboxyl quantum dots [J]. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 2015, 15(10): 7871-7875.
- [13] Lin J Q, Ruan Q Y, Chen G N, *et al.* Research progress of surface enhanced Raman spectroscopy for cancer detection [J]. *Laser & Optoelectronics Progress*, 2013, 50(8): 080020.
林居强, 阮秋咏, 陈冠楠, 等. 基于表面增强拉曼散射技术的癌症检测研究进展[J]. *激光与光电子学进展*, 2013, 50(8): 080020.
- [14] Yang S M, Yao H, Zhang D P, *et al.* Droplet-based dielectrophoresis device for on-chip nanomedicine fabrication and improved gene delivery efficiency[J]. *Microfluidics and Nanofluidics*, 2015, 19(1): 235-243.
- [15] Mark D, Haeberle S, Roth G, *et al.* Microfluidic lab-on-a-chip platforms: Requirements, characteristics and applications[J]. *Chemical Society Reviews*, 2010, 39(3): 1153-1182.
- [16] Sangamithirai D, Munusamy S, Narayanan V, *et al.* Fabrication of neurotransmitter dopamine electrochemical sensor based on poly(*o*-anisidine)/CNTs nanocomposite [J]. *Surfaces and Interfaces*, 2016, 4: 27-34.
- [17] Gu B, Sheng X, Ye Z C. Research on quantum dot apply to LCD backlight[J]. *Laser & Optoelectronics Progress*, 2015, 52(2): 022201.
顾宝, 盛欣, 叶志成. 量子点应用于液晶显示背光的研究[J]. *激光与光电子学进展*, 2015, 52(2): 022201.
- [18] Jokerst J V, Jacobson J W, Bhagwandin B D, *et al.* Programmable nano-bio-chip sensors: Analytical meets clinical [J]. *Analytical Chemistry*, 2010, 82(5): 1571-1579.
- [19] Baird C L, Myszkka D G. Current and emerging commercial optical biosensors [J]. *Journal of Molecular Recognition*, 2001, 14(5): 261-268.
- [20] Dunbar S A, Vander Zee C A, Oliver K G, *et al.* Quantitative, multiplexed detection of bacterial pathogens: DNA and protein applications of the Luminex LabMAP™ system [J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2003, 53(2): 245-252.
- [21] Croft H, Malinowski T, Krizbai L, *et al.* Use of Luminex xMAP-derived Bio-Plex bead-based suspension array for specific detection of PPV W and characterization of epitopes on the coat protein of the virus[J]. *Journal of Virological Methods*, 2008, 153(2): 203-213.

- [22] Chen F T. Research of diagnosis for early breast carcinoma by surface enhanced laser desorption/ionization-time of flight-mass spectrometry [D]. Shanghai: Second Military Medical University, 2009: 12-28.
陈锋涛. SELDI 质谱技术在乳腺癌早期诊断中的应用研究[D]. 上海: 第二军医大学, 2009: 12-28.
- [23] Cui D F, Wang Y J, Cai H Y, *et al.* Detection of 6-oxyguanine-DNA methyltransferase by SPR Biochemical Analyzer. [J]. Progress in Natural Science, 2003, 13(8): 874-876.
崔大付, 王子杰, 蔡浩原, 等. SPR 生化分析仪对 6-氧甲基鸟嘌呤-DNA 甲基转移酶的检测[J]. 自然科学进展, 2003, 13(8): 874-876.
- [24] Niu Y. Research on induction biology system and application of elliptical imaging protein chip biosensor [D]. Beijing: University of Chinese Academy of Sciences, 2011: 22-48.
牛宇. 椭圆成像蛋白质芯片生物传感器感应生物学系统和应用研究[D]. 北京: 中国科学院大学, 2011: 22-48.
- [25] Zhang Y, Bai Z C, Huang Z L, *et al.* Influence of distance between CdSe quantum dot and gold nanoparticle on system fluorescence [J]. Laser & Optoelectronics Progress, 2018, 55(7): 072601.
张莹, 白忠臣, 黄兆岭, 等. 金纳米粒子与 CdSe 量子点间的距离对体系荧光的影响[J]. 激光与光电子学进展, 2018, 55(7): 072601.
- [26] Xiao F Z. Preparation and application of biochip carriers based on nano-membranes [D]. Hengyang: University of South China, 2008: 5-20.
肖方竹. 纳米膜基底型生物芯片载体制备及应用研究[D]. 衡阳: 南华大学, 2008: 5-20.