

基于水溶性导电高分子材料的高灵敏度生物传感器

徐慧 武海萍 樊春海* 李文新 张治洲 贺林

(中国科学院上海应用物理研究所, 纳米生物医药研究室, 上海 201800; 中国科学院研究生院, 北京 100039; 上海交通大学 Bio-X 生命科学研究中心, 上海 200030. * 联系人, E-mail: fchh@sin.ac.cn)

摘要 导电高分子材料是一类重要的有机高分子材料, 已经在很多领域发挥了重要作用. 水溶性导电高分子材料在荧光生物传感器中的应用是高分子材料科学与生物科学交叉的重要组成部分. 导电高分子材料具有很高的光能采集效率和荧光特性, 同时又具有“分子导线”功能. 利用导电高分子材料的光能采集与电子/能量传递作用实现在荧光生物传感中的信号倍增效应可以有效地提高传感检测的灵敏度, 并可以实现以此为基础的高灵敏度生物传感器. 对水溶性导电高分子材料通过电子传递或能量传递作用实现在基因、抗体、酶等方面的检测应用进行了综述, 并探讨了实现固相传感和芯片化检测的可能性. 在对已有工作进行总结的基础上, 讨论了这一领域的主要研究方向.

关键词 导电高分子 生物传感器 荧光检测 基因检测 固相传感

生物传感器研究综合了生物技术、信息技术、纳米科学、界面科学等众多领域以及光声电色等各种技术, 因而长期以来一直受到相关学科研究者的高度重视. 生物传感器在基础与应用方面都具有重要的意义. 一方面, 新型生物传感器的设计与开发涉及到很多基本的科学问题, 这为基础研究提供了很多源头创新思路. 另一方面, 新型生物传感器的研制对于遗传分析、临床检测、环境检测、生物战和国家安全防御等方面都可能产生重要影响. 尤其值得注意的是, 人类基因组计划实施以来生物芯片的研究与应用高潮吸引了各个领域的研究人员涉足生物传感器研究领域, 世界各国均对生物传感器与生物芯片(即阵列化生物传感器)的研究进行高强度的投入. 目前, 生物传感器和生物芯片公司已成为国际上高科技公司中最活跃的部分之一, 其市场应用前景不可估量.

高分子材料(塑料)在传统观念中是不导电的绝缘体, 然而Heeger教授和他的合作者McDiarmid、白川英树等在 1970 年代首先发现共轭高分子材料在特定条件下可以具有半导体甚至金属的导电性. 这一突破性发现导致了塑料(光)电子(plastic optoelectronics)研究领域的创立, Heeger等人因此获得 2000 年诺贝尔化学奖^[1]. 目前, 以基于导电高分子材料的发光二极管, 平面显示器, 太阳能电池为代表的“塑料电子学”已经成为材料领域和高新技术领域的研究热点, 而导电高分子材料与其它新学科的交叉仍然在进行中并且有可能产生更具广阔前景的研究领域. 导电高分子材料与生命科学相互渗透所形成的交叉

学科就是这样一个领域, 目前这一领域其所展现出来的应用前景已经吸引了众多研究者. 生物传感器作为一个具有广泛交叉特点的综合研究领域, 则很可能是把导电高分子材料引入生命科学的一个重要结合点.

1 导电高分子的生物传感应用原理

共轭导电高分子材料作为生物传感元件(Biosensing element)具有一些独特的传统传感材料所不具有的优点. 首先导电高分子材料摩尔消光系数可达 $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ 数量级, 吸光能力非常强, 因而是一个非常好的光能采集器(light harvester). 其次导电高分子链具有“分子导线”(molecular wire)功能, 其共轭骨架允许电子或能量在整条链上自由流动, 因而这些由很多个单体采集的光能以集合的形式高效地传递到电子传递或能量传递受体上^[2]. 一个典型的例子就是被称为超猝灭(superquenching)的现象. 在基于常规的小分子荧光-猝灭剂体系荧光检测中, 一个猝灭剂只能猝灭一个荧光分子的荧光(即 1:1); 而由于共轭高分子链上大 π 键的存在, 猝灭剂结合到链上的任何一个位点都可能阻遏整条链上的电子或能量流动, 从而改变其荧光特性, 即一个猝灭剂可能猝灭整条共轭导电高分子链发出的荧光(1:n; n对应于高分子链的聚集度). 这样就产生了一个显著的信号倍增效应(可从数千倍到数百万倍甚至更高). 麻省理工学院的Swager研究组首先利用这一原理设计了一系列可用于有机相中传感检测的化学传感器^[2].

接着,美国Los Alamos国家实验室的研究者将共轭高分子材料衍生化,使之成为水溶性分子,从而使共轭高分子材料的这一独特优点能够被引入到生物传感检测中^[3]. 这些研究突破预示着一个全新的基于导电高分子材料的生物传感领域的形成^[4],此后研究者们从荧光猝灭的成因,新型共轭导电高分子材料设计,新生物检测体系的建立等各个角度出发在基础和应用层面都获得了重要进展. 国内一些研究组也开始进入这一领域并在新材料合成、检测应用等方面取得了一些重要结果^[5,6].

2 导电高分子作为传感元件(sensing element)的荧光生物传感器

2.1 基于电子传递的溶液相荧光生物传感器

聚苯乙炔(polyphenylenevinylene)类材料是典型的导电高分子材料,同时也是良好的荧光材料. Chen等人发现,水溶性的磺酸基衍生化的MPS-PPV发出的荧光可以被电子传递受体甲基紫高效猝灭^[3]. 荧光猝灭效率通常用Stern-Volmer常数 K_{sv} 表征,这一体系的 K_{sv} 值达到 10^7 ,而相应的单体荧光分子/甲基紫体系的 $K_{sv}=15$. 这一高效猝灭来自于两个原因,一是磺酸阴离子与阳离子的甲基紫之间的静电吸引力起了富集的作用;二是共轭的PPV链使一个甲基紫猝灭剂可以猝灭几百个单体的荧光. 实验证明后者即共轭链的作用占主导地位. 基于这一发现,Chen等提出了一个基于导电高分子材料的全新传感思路:将甲基紫连接上一个生物分子探针(quencher-tether-ligand, QTL),QTL同样可以猝灭MPS-PPV的荧光. 当QTL探测到目的检测物的时候,生物分子探针与目的检测物结合使猝灭剂甲基紫远离MPS-PPV,从而导致荧光猝灭效率的降低以及荧光的恢复(见图1). 基于生物识别导致的MPS-PPV荧光强度的变化他们成功地实现了生物素-亲和素这一模型传感体系的探测,其检测限可以达到nM数量级^[3].

这一被称为QTL的生物传感体系可以被推广到很多生物体系的灵敏检测,例如血糖^[7]、基因、抗体检测等,因而引起了研究者的广泛兴趣. 例如, Bazan等人的研究表明,PPV的寡聚体相对于高分子聚合物来说不仅结构可控,而且受环境影响(如表面活性剂的存在)较小,因而可能作为很好的传感平台^[8]. Fan等人发现天然电子传递蛋白质细胞色素c可以作为很好的电子传递猝灭剂,而且通过改变蛋白质的表

面电荷可以非常有效地调控其猝灭效率,这为生物传感器的设计提供了一个高度灵活可调的体系^[9]. 进一步的研究表明,金纳米粒子可以作为阳离子聚芴高分子(Polyfluorene)的纳米猝灭剂,其 K_{sv} 值达到 10^{11} ,这是目前报道过的最高的荧光猝灭效率,相对于小分子染料/猝灭剂体系而言提高了9~10个数量级. 实验表明,皮摩尔浓度(pM)的金粒子就可以引起可以分辨的荧光变化,也就是说可能将这一体系研制成超高灵敏度,检测限可超过pM的生物传感器^[10].

2.2 基于能量传递的溶液相荧光生物传感器

导电高分子材料不仅可以通过电子传递过程实现信号倍增效应, Gaylord等的研究表明,通过能量传递也可以提高检测信号^[11]. 聚芴是一个发蓝光的材料,可以与荧光素(fluorescein)发生很好的FRET(Foster resonance energy transfer). 聚芴共轭分子是一个良好的光能采集器,其采集的能量通过FRET高效传递到荧光素,从而可以显著提高荧光素的荧光强度. 他们利用这一原理研制了一个高灵敏度的新型基因检测器(见图2). 这一基因检测器由阳离子的聚芴和荧光素标记的肽链核酸(PNA)探针组成. PNA是一个核酸类似物,呈电中性,因而与聚芴之间的作用力很弱,聚芴与荧光素之间FRET距离较长不能有效地传递能量. 一旦PNA探针检测到目的基因,由于核酸是一个阴离子聚合物,可以和阳离子聚芴形成静电复合物,从而缩短了聚芴到荧光素之间的FRET距离,即基因检测过程将伴随着荧光素荧光强度的增强. 通过这种检测方法,他们可以检测到10 pM的特异性基因序列^[11].

基因检测往往要求能够进行多色(multi-color)检测,以实现多种序列的同时检测. 最近Liu等提出可以通过对聚芴链骨架的掺杂实现CCP基因传感器的多色检测,并原理性地证实其可行性^[12]. Wang等提出一个新方法,可以提高CCP检测的选择性. 他们引入了溴乙啶(ethidium bromide, EB)这一核酸双螺旋插入剂,能量可以从聚芴传递到荧光素再传递到EB实现两级FRET传递,EB对双螺旋有很好的选择作用,因而这种方法可以极大地提高CCP基因检测器对不相干DNA序列的选择性^[13].

这种基于静电力的传感器还可以推广到蛋白质-核酸检测体系. 例如Wang等通过对艾滋病相关的tat多肽的荧光素标记,实现了对TAR RNA的灵敏检测. Tat多肽是一个带部分正电荷的肽段,因而荧光素与

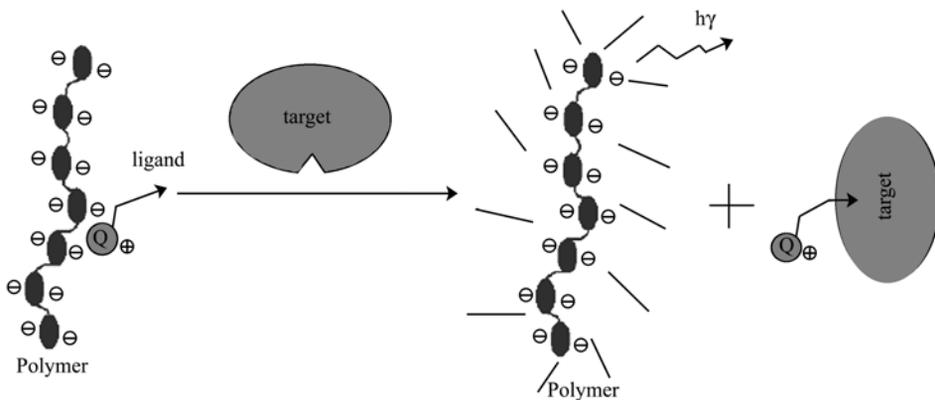


图 1 基于电子传递的生物传感策略

在检测之前,带正电荷的猝灭剂(Q)及连接的探针配体(ligand)可以通过静电吸附力靠近带负电荷的导电高分子材料,从而猝灭后者的荧光.在检测到目的产物之后,配体与目的检测物(target)的结合增加了猝灭剂到导电高分子之间的距离,从而导致荧光猝灭效率的下降.通过荧光强度的变化可以进行目的检测物的生物传感

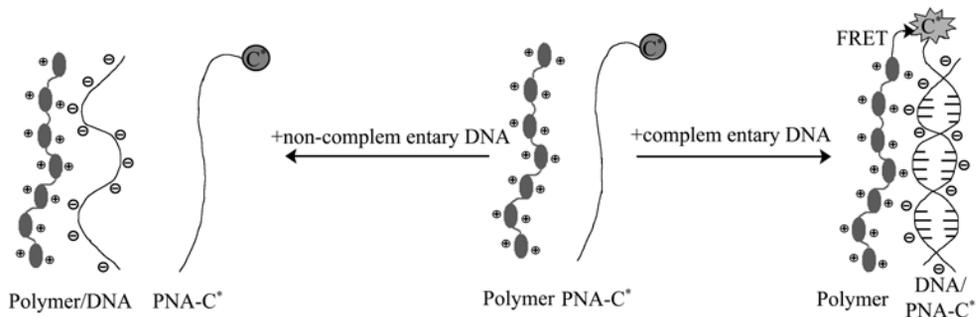


图 2 基于能量传递的生物传感策略

电荷中性的肽链核酸(PNA)与阳离子聚苂之间的作用力很弱,聚苂与 PNA 上标记的荧光素之间 FRET 距离较长不能有效地传递能量.一旦 PNA 探针检测到目的基因,由于核酸是一个阴离子聚合物,可以和阳离子聚苂形成静电复合物,从而缩短了聚苂到荧光素之间的 FRET 距离,即基因检测过程将伴随着荧光素荧光强度的增强.而如果只有不配对 DNA, PNA 仍然不能靠近聚苂,因而荧光强度没有明显变化

聚苂不能靠近, FRET 效率很低,一旦 tat 结合特异性的 TAR RNA 序列,阴离子的 RNA 与阳离子的聚苂形成静电复合物,拉近了聚苂与荧光素之间的距离,从而可以从 FRET 信号的出现来检测 TAR RNA. TAR RNA 是已知的 HIV RNA 上的特异性序列,因而这种方法可以有效地进行对艾滋病毒的检测^[14].

2.3 固相荧光生物传感器

固相生物传感器能够重复使用,而且可以很方便地发展成为生物芯片(阵列化生物传感器),因而是生物传感器研究的重要发展方向.基于导电高分子材料的生物传感器也可以实现固定化检测. Whitten 研究组首先发现导电高分子材料可以通过自组装或共价键合的方式连接到聚苯乙烯粒子表面,同时仍然保持了荧光特性和超猝灭的能力,因而可以用于

QTL 型生物传感检测(见图 3). 他们通过这种方法实现了对炭疽热病毒相关序列的检测,可以分辨 500 pmol 的核酸序列^[15]并可以实现对单碱基错配的分辨^[16]. 更进一步的,他们用类似的原理实现了蛋白质检测. 例如,蛋白激酶(protein kinase)是在细胞代谢、生长、分化和增殖中非常重要的蛋白质,他们发展出的 QTL Ligherspeed 检测器可以达到皮克(pg)级,同时可以进行实时监测,远优于其它检测方法^[17]. 最近他们又研制出一种蛋白酶(protease)检测器. 又如,β-secretase 是和 Alzheimer's 症相关的一种蛋白酶,最近的研究表明这种基于导电高分子的固相检测器利用蛋白酶对多肽底物的切割作用同样能够进行检测,他们可以在 1 小时内探测到~10 fmol 的 β-secretase^[18,19].

组装在粒子表面的导电高分子可以在某种意义

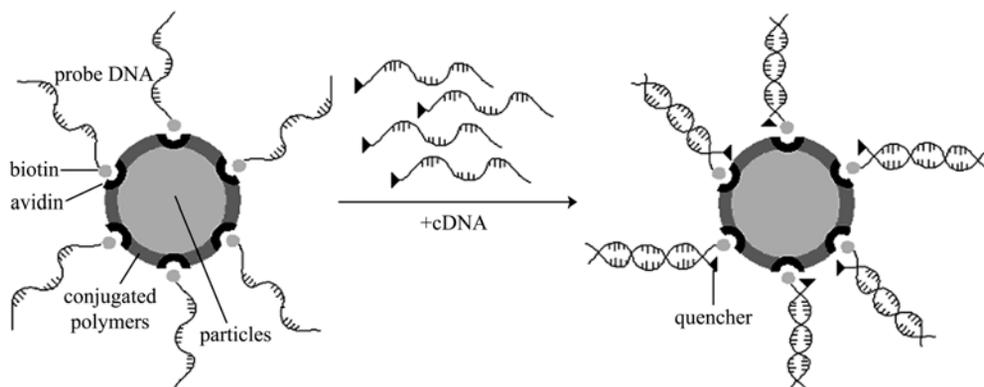


图3 聚苯乙烯粒子表面吸附着导电高分子材料和亲合素以及生物素修饰的DNA探针
在检测之前,粒子表面的导电高分子材料可以发出荧光;在检测之后,带有猝灭剂的目的基因的结合使荧光显著降低

上实现固相传感检测,然而真正意义上可用于芯片检测的传感器要求实现在固体基底表面的组装和检测。最近,Nilsson等将水溶性聚噻吩材料通过spin-coating的方法固定在玻璃上,然后通过微流芯片实现了对DNA的芯片级检测^[20]。这是第一个成功地在芯片表面利用导电高分子材料进行生物传感检测的例子。然而通过spin-coating固定的高分子材料很难控制结构、厚度等,因而如果要进一步提高性能的话可能需要发展有序固定导电高分子材料的方法。Wang等通过层层(layer-by-layer)组装的方法,利用导电高分子链与间隔物(spacer)之间的静电吸引力实现了在石英基底上的组装^[21],并且他们发现这种方式组装的导电高分子材料不仅结构有序可控,而且可以保持荧光特性。尤其值得注意的是,这种导电高分子自组装结构可以实现单向的能量传递,电子传递受体C60可以高效猝灭其荧光,因而这一发现为实现有序可控的固相生物传感器奠定了基础^[22]。

3 总结与展望

水溶性导电高分子材料在荧光生物传感器中的应用是近几年提出的概念。这一方法充分利用了导电高分子材料的光能采集和高效电子/能量传递作用,可以通过导电高分子的介导提高光能采集和能量传递这两个过程的效率,从而实现荧光生物传感检测的信号倍增。这为高灵敏度的生物传感检测提供了一条有效途径,因而引起了国内外研究者的广泛注意。具体而言,目前的研究主要集中在以下几个方面:1)猝灭过程的机理研究。已有的研究表明这一过程可能有电子转移猝灭,能量转移猝灭,猝灭剂诱导高分

子链聚集而导致荧光自猝灭等多方面因素的共同参与,然而明确的机理还有待于进一步研究^[23-27]。2)寻找高效荧光猝灭体系。基于共轭导电高分子材料的生物传感器其检测灵敏度直接依赖于荧光猝灭效率,因而寻找高效荧光猝灭体系可以说是这一生物传感体系的核心研究问题。研究者已经从新型高分子材料的合成、生物与纳米猝灭剂等角度出发提出了一些新猝灭体系^[28-32]。3)检测特异性问题。导电高分子材料的引入显著提高了生物传感检测的灵敏度,然而由于生物分子与导电高分子链间的非特异性吸附等问题往往导致传感器的选择性较低,这是目前这一新型生物传感器所面临的主要挑战性问题之一。Heeger研究组和Whitten研究组分别提出的通过中和导电高分子链电荷的方法可以在相当程度上解决检测特异性问题^[33-35],然而仍然需要进一步的研究并提出新的策略以使之成为真正具有实用意义的生物传感检测器。4)新生物检测体系的建立。在对此导电高分子介导的荧光生物传感体系深入了解的基础上,并结合生物学研究建立生物识别的新体系,并有可能将这一传感系统建立成为一个具有广泛应用的生物传感平台^[4]。5)在其它相关领域的应用。导电高分子材料的引入可以有效提高检测生物分子识别过程的灵敏度,这除了在生物检测领域有重要意义外,也可能对其它与生物分子识别相关的领域有所推动。例如目前DNA计算机是建立在DNA杂交过程的荧光检测基础上的^[36-38],因而基于导电高分子材料的DNA检测方法可以显著提高检测灵敏度,从而有可能用于提高DNA计算机的计算容量。

致谢 本工作为中国科学院百人计划项目, 并得到 Bio-X DNA 计算机联合项目(BDCC, 03DZ14025)的部分资助。

参 考 文 献

- 1 Heeger A J. Semiconducting and metallic polymers: the fourth generation of polymeric materials (Nobel Lecture). <http://www.nobel.se>, 2000
- 2 Swager T M. The molecular wire approach to sensory signal amplification. *Acc Chem Res*, 1998, 31: 201~207 [\[DOI\]](#)
- 3 Chen L, McBranch D W, Wang H L, et al. Highly sensitive biological and chemical sensors based on reversible fluorescence quenching in a conjugated polymer. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96(22): 12287~12292 [\[DOI\]](#)
- 4 Heeger P S, Heeger A J. Making sense of polymer-based biosensors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96(22): 12219~12221 [\[DOI\]](#)
- 5 Fan Q, Lu S, Lai Y, et al. Synthesis, characterization, and fluorescence quenching of novel cationic phenyl-substituted poly(p-phenylenevinylene)s. *Macromolecules*, 2003, 36(19): 6976~6984 [\[DOI\]](#)
- 6 Tong H, Wang L X, Jing X B, et al. Highly selective fluorescent chemosensor for silver(I) ion based on amplified fluorescence quenching of conjugated polyquinoline. *Macromolecules*, 2002, 35(19): 7169~7171 [\[DOI\]](#)
- 7 DiCesare N, Pinto M R, Schanze K S, et al. Saccharide detection based on the amplified fluorescence quenching of a water-soluble Poly(phenylene ethynylene) by a boronic acid functionalized benzyl viologen derivative. *Langmuir*, 2002, 18(21): 7785~7787 [\[DOI\]](#)
- 8 Gaylord B S, Wang S, Heeger A J, et al. Water-soluble conjugated oligomers: effect of chain length and aggregation on photoluminescence-quenching efficiencies. *J Amer Chem Soc*, 2001, 123(26): 6417~6418 [\[DOI\]](#)
- 9 Fan C, Plaxco K W, Heeger A J. High-efficiency fluorescence quenching of conjugated polymers by proteins. *J Am Chem Soc*, 2002, 124(20): 5642~5643 [\[DOI\]](#)
- 10 Fan C, Wang S, Hong J W, et al. Beyond superquenching: hyper-efficient energy transfer from conjugated polymers to gold nanoparticles. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(11): 6297~6301 [\[DOI\]](#)
- 11 Gaylord B S, Heeger A J, Bazan G C. DNA detection using water-soluble conjugated polymers and peptide nucleic acid probes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(17): 10954~10957 [\[DOI\]](#)
- 12 Liu B, Bazan G C. Interpolyelectrolyte complexes of conjugated copolymers and DNA: platforms for multicolor biosensors. *J Am Chem Soc*, 2004, 126(7): 1942~1943 [\[DOI\]](#)
- 13 Wang S, Gaylord B S, Bazan G C. Fluorescein provides a resonance gate for FRET from conjugated polymers to DNA intercalated dyes. *J Am Chem Soc*, 2004, 126(17): 5446~5451 [\[DOI\]](#)
- 14 Wang S, Bazan G C. Optically amplified RNA-protein detection methods using light-harvesting conjugated polymers. *Adv Mat*, 2003, 15(17): 1425~1428 [\[DOI\]](#)
- 15 Kushon S A, Bradford K, Marin V, et al. Detection of single nucleotide mismatches via fluorescent polymer superquenching. *Langmuir*, 2003, 19(16): 6456~6464 [\[DOI\]](#)
- 16 Kushon S A, Ley K D, Bradford K, et al. Detection of DNA hybridization via fluorescent polymer superquenching. *Langmuir*, 2002, 18(20): 7245~7249 [\[DOI\]](#)
- 17 Xia W, Rininsland F, Wittenburg S K, et al. Applications of fluorescent polymer superquenching to high throughput screening assays for protein kinases. *Assay Drug Dev Technol*, 2004, 2(2): 183~192 [\[DOI\]](#)
- 18 Pinto M R, Schanze K S. Amplified fluorescence sensing of protease activity with conjugated polyelectrolytes. *Proc Natl Acad Soc USA*, 2004, 101(20): 7505~7510 [\[DOI\]](#)
- 19 Kumaraswamy S, Bergstedt T, Shi X, et al. Fluorescent-conjugated polymer superquenching facilitates highly sensitive detection of proteases. *Proc Natl Acad Soc USA*, 2004, 101(20): 7511~7515 [\[DOI\]](#)
- 20 Peter K, Nilsson R, Inganas O. Chip and solution detection of DNA hybridization using a luminescent zwitterionic polythiophene derivative. *Nat Mat*, 2003, 2: 419~424 [\[DOI\]](#)
- 21 Wang H L, McBranch D W, Klimov V I, et al. Controlled unidirectional energy transfer in luminescent self-assembled conjugated polymer superlattices. *Chem Phys Lett*, 1999, 315: 173~180 [\[DOI\]](#)
- 22 Wang H, McBranch D W, Donohoe R J, et al. Highly efficient energy and charge transfer in thin self-assembled multilayered polymer films. *Syn Met*, 2001, 121: 1367~1368 [\[DOI\]](#)
- 23 Tan C, Pinto M R, Schanze K S. Photophysics, aggregation and amplified quenching of a water-soluble poly(phenylene ethynylene). *Chem Commun*, 2002, 5: 446~447 [\[DOI\]](#)
- 24 Stork M, Gaylord B S, Heeger A J, et al. Energy transfer in mixtures of water-soluble oligomers: Effect of charge, aggregation, and surfactant complexation. *Adv Mater*, 2002, 14: 361~366 [\[DOI\]](#)
- 25 Wang J, Wang D, Miller E K, et al. Photoluminescence of water-soluble conjugated polymers: Origin of enhanced quenching by charge transfer. *Macromolecules*, 2000, 33: 5153~5158 [\[DOI\]](#)
- 26 Fan C, Hirasawa T, Plaxco K W, et al. Photoluminescence quenching of water-soluble conjugated polymers by viologen derivatives: Effect of hydrophobicity. *Langmuir*, 2003, 19: 3554~3556 [\[DOI\]](#)
- 27 Place I, Perlstein J, Penner T L, et al. Stabilization of the aggregation of cyanine dyes at the molecular and nanoscopic level. *Langmuir*, 2000, 16: 9042~9048 [\[DOI\]](#)
- 28 Song X, Wang H, Shi J, et al. Conjugated polymers as efficient fluorescence quenchers and their applications for bioassays. *Chem Mater*, 2002, 14: 2342~2347 [\[DOI\]](#)
- 29 Huang F, Wu H, Wang D, et al. Novel electroluminescent conjugated polyelectrolytes based on polyfluorene. *Chem Mater*, 2004, 16: 708~716 [\[DOI\]](#)
- 30 Lu L, Helgeson R, Jones R M, et al. Superquenching in cyanine pendant Poly(L-lysine) dyes: Dependence on molecular weight, solvent, and aggregation. *J Am Chem Soc*, 2002, 124(3): 9
- 31 Jones R M, Bergstedt T S, Buscher C T, et al. Superquenching and its applications in J-aggregated cyanine polymers. *Langmuir*, 2001, 17: 2568~2571
- 32 Jones R M, Lu L, Helgeson R, et al. Building highly sensitive dye assemblies for biosensing from molecular building blocks. *Proc Natl Acad Soc USA*, 2001, 98(26): 14769~14772 [\[DOI\]](#)
- 33 Wang D L, Gong X, Heeger P S, et al. Biosensors from conjugated polyelectrolyte complexes. *Proc Natl Acad Soc USA*, 2002, 99(1): 49~53 [\[DOI\]](#)
- 34 Chen L H, Xu S, McBranch D, et al. Tuning the properties of conjugated polyelectrolytes through surfactant complexation. *J Am Chem Soc*, 2000, 122(38): 9302~9303 [\[DOI\]](#)
- 35 Jones R M, Bergstedt T S, McBranch D W, et al. Tuning of superquenching in layered and mixed fluorescent polyelectrolytes. *J Am Chem Soc*, 2001, 123(27): 6726~6727 [\[DOI\]](#)
- 36 Adleman L M. Molecular computation of solutions to combinatorial problems. *Science*, 1994, 266: 1021~1024
- 37 Zhang Z, Zhao J, He L. Progress in molecular biology study of DNA computer. *Acta Genet Sinica*, 2003, 30 (9): 886~892
- 38 Zhao J, Zhang Z, Shi Y, et al. Linearly programmed DNA-based molecular computer operated magnetic particle surface in test-tube. *Chin Sci Bull*, 2004, 49(1): 17~22

(2004-07-08 收稿, 2004-08-04 收修改稿)