

技术与方法

DOI: 10.3969/j.issn.0253-3626.2012.02.013

2种聚乙二醇不饱和酸单酯共聚合包被 Fe_3O_4 制备磁性微球及其表征

刘 冬, 龙高波, 杨晓兰, 蒲 军, 赵 华, 廖 娟, 廖 飞

(重庆医科大学检验医学院, 重庆 400016)

【摘要】目的: 用两种聚乙二醇(Polyethylene glycol, PEG)不饱和酸单酯经自由基共聚合包被纳米 Fe_3O_4 磁芯制备磁性微球, 考察其功能化后特异性和非特异性结合作用。方法: 水解沉淀法制备纳米 Fe_3O_4 磁芯; 用 PEG-350 单甲醚丙烯酸酯和 PEG-1540 单顺丁烯酸单酯为单体, 在正庚烷-水组成的油包水体系自由基共聚制备磁性微球; 将微球表面来自 PEG-1540 的羟基经甲磺酸酯活化、连接乙二胺后再用活化生物素修饰。透射电镜观察其外貌; 测定与碱性磷酸酶标记链亲和素(Streptavidin labeled by alkaline phosphate, AP-SAV)的特异性结合、与 4-硝基-1-萘酚苯甲酸酯等的非特异性结合。结果: 所得 Fe_3O_4 粒径 60 nm 左右, 生物素修饰后粒径接近 200 nm。此磁性微球可从混合蛋白中选择性分离碱性磷酸酶标记的链亲和素, 结合容量约 51 ng 蛋白/g 磁性微球; 4-硝基-1-萘酚苯甲酸酯在浓度很低时同此磁性微球的结合低于检测限, 在浓度高达 64 $\mu\text{mol/L}$ 时仍无显著结合。结论: 用两种 PEG 不饱和酸酯共聚合包被 Fe_3O_4 可制备表面亲水磁性微球, 功能化后有特异相互作用且非特异性作用很弱, 但还需提高此磁性微球功能化后的特异性结合容量。

【关键词】磁性微球; 聚乙二醇不饱和酸酯; 自由基共聚合; 功能化; 疏水性

【中国图书分类法分类号】Q81

【文献标志码】A

【收稿日期】2011-01-31

Preparation and characterization of magnetic microspheres coated with copolymers of two unsaturated monoesters of poly(ethylene glycol)

LIU Dong, LONG Gaobo, YANG Xiaolan, PU Jun, ZHAO Hua, LIAO Juan, LIAO Fei

(College of Laboratory, Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To prepare and characterize magnetic microspheres coated with copolymers of two unsaturated esters of Polyethylene glycol(PEG). **Methods:** Fe_3O_4 nanoparticles were prepared by a chemical co-precipitation method. Magnetic microspheres were prepared by coating Fe_3O_4 cores with copolymers of monomethoxyl-PEG 350 acrylate and the single maleic acid ester of PEG 1540. Hydroxyl groups on the surfaces were converted to methanesulfonate that was reacted with ethylene diamine; the resulting amino groups were modified with an activated biotin ester. Microsphere sizes were examined by transmission electronic microscopy. The specific bindings were tested with streptavidin labeled by alkaline phosphatase; the nonspecific bindings were tested with 4-nitro-1-naphthylol benzoate and analyzed via HPLC-UV. **Results:** Fe_3O_4 cores had the diameters of about 60 nm with wide distributions while the biotinylated magnetic microspheres had the diameters of about 200 nm. The biotinylated magnetic microspheres selectively recovered the labeled streptavidin from the lysate of *E.coli* with a binding capacity of about 51 ng protein/g magnetic microspheres. 4-nitro-1-naphthylol benzoate at low concentrations had negligible bindings; its binding ratio increased but still had no significance even at 64 $\mu\text{mol/L}$. **Conclusion:** Hydrophilic magnetic microspheres prepared by coating Fe_3O_4 cores with copolymers of two unsaturated esters of PEG can be functionalized to exert the designed specific interactions while negligible nonspecific interactions with hydrophobic compounds, but the binding capacity needs further enhancement.

【Key words】magnetic microspheres; unsaturated esters of polyethylene glycol; copolymerization; functionalization; hydrophobicity

表面有特殊蛋白或配体的磁性微球可用于磁分离所结

作者介绍: 刘 冬(1984-), 女, 硕士,

研究方向: 配体类药物筛选技术。

通信作者: 廖 飞, 男, 教授, Email: liaofeish@sina.com。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(编号: 30472139); 重庆市教委科技资助项目(编号: KJ100313)。

合成分、筛选配体类药物或探索分子作用网络^[1-4], 及磁共振成像和免疫分析等^[5,6]。这些应用都要求磁性微球: ①表面被化学惰性物质包被并保留磁性; ②表面有高反应活性基团或可活化基团; ③非特异性结合尽可能低。磁性微球表面亲水性越高则非特异作用越弱。聚乙二醇(Polyethylene glycol, PEG)亲水性好, 与常见物质非特异性结合很弱, 除了末端羟

基外化学反应惰性。PEG 单甲醚的丙烯酸酯经自由基共价聚合包被纳米磁芯可制备表面亲水磁性微球^[7],但其表面缺乏可反应官能团而难以功能化^[8]。如用 PEG 单甲醚的不饱和酸酯和一端为羟基的长链 PEG 单顺丁烯二酸单酯为单体经自由基共聚包被纳米磁芯,所得亲水磁性微球表面有来自长链 PEG 的末端羟基,可用于连接特定物质使其功能化。生物素对链亲和素有很高亲和力^[9]。本文用 PEG-350 单甲醚和 PEG-1540 单不饱和酸酯为单体,经自由基共聚包被纳米磁芯制备磁性微球,考察其用生物素修饰后的特异性和非特异性结合作用。

1 材料和方法

1.1 主要化学试剂

四水合氯化亚铁($\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)、六水合氯化铁($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)、顺丁烯二酸酐、N,N'-亚甲基双丙烯酰胺、聚乙二醇 1540(PEG-1540)都为国药集团的分析纯化学试剂,氨水($\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$)和柠檬酸为重庆川东化工有限公司分析纯试剂,N,N'-二环己基碳二亚胺(DCC)、N-羧基琥珀酰亚胺、过硫酸钾为上海晶纯实业有限公司分析纯试剂,PEG-350 单甲醚和 4-硝基苯基磷酸二钠盐(PNPP)来自 Sigma,甲磺酰氯为天津光复精细化工研究所分析纯试剂,碱性磷酸酶标记链亲和素(AP-SA)来自 Promega,二羧基琥珀酸磺酸钠、4-硝基苯甲酸甲酯、4-硝基-1-萘酚来自 Alfa Aesar。大肠杆菌裂解液为常规培养 BL21 细胞株后超声裂解、高速离心去沉淀的上清液,适当稀释将其总蛋白浓度调整到 2.0 g/L^[10]。

1.2 Fe_3O_4 纳米磁芯的制备

取适当 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 和 $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 配成溶液,移入三口烧瓶中;在 N_2 保护环境中搅拌状态下向溶液中缓慢滴加氨水。维持在 pH 10(溶液 pH >9 时开始生成棕褐色 Fe_3O_4 颗粒)。所得颗粒在 70℃ 熟化 30 min^[11]。

1.3 2 种 PEG 不饱和酸单酯的制备

将 1.2 g PEG-1540 固体加入三颈瓶,水浴至 55℃ 融化后机械搅拌,并在 N_2 保护下加入过量 10% 的顺丁烯二酸酐,待两者融化后加入催化剂对甲苯磺酸(质量比 3%);再升温到 70℃ 反应 3 h 后,用乙醚将产物沉淀并洗涤 3 次,所得白色固体为 PEG-1540 单顺丁烯二酸单酯^[12]。将 PEG-350 单甲醚溶于二氯甲烷,置于冰水浴中磁力搅拌下避光滴加丙烯酰氯,再滴加三乙胺;逐渐升温至室温,反应 24 h 后出现大量沉淀并滤去;除去二氯甲烷,用饱和硫酸铵水溶液洗 3 次得亮黄色油状物为 PEG-350 单甲醚丙烯酸酯^[13]。

1.4 PEG 不饱和酸酯共价聚合包被磁性微球

二羧基琥珀酸磺酸钠、水与正庚烷形成油包水乳剂,超声除氧并通氮气,机械搅拌下加入 Fe_3O_4 纳米磁芯,再加入 PEG-1540 单顺丁烯二酸单酯、PEG-350 单甲醚丙烯酸酯和甲叉双丙烯酰胺三者的饱和水溶液,搅拌均匀后加入少量过硫酸铵饱和水溶液,37℃ 反应 8 h。用 Promega 磁分离器(PolyAtract System 1000)回收 PEG 包被磁性微球,甲醇:丙酮(1:9)洗 3 次,双蒸水洗 3 次后四氢呋喃洗涤悬浮^[14]。

1.5 磁性微球表面羟基活化和生物素化

将三正丁胺和甲磺酰氯溶于干燥四氢呋喃中,冰水浴下滴加到悬浮于干燥四氢呋喃的包被磁性微球中;25℃ 震荡(250 r/min)反应 24 h。强磁场回收磁性微球,用四氢呋喃洗涤后悬浮于干燥四氢呋喃中;加 5 倍摩尔量乙二醇反应 24 h,强磁力回收表面氨基化的磁性微球,用四氢呋喃洗涤 3 次;参照此方法制备 N-羧基琥珀酰亚胺基生物素酯^[15],再与所得氨基化磁性微球在 25℃ 震荡反应 24 h,得到生物素化磁性微球;强磁场回收磁性微球,用四氢呋喃洗涤、磷酸盐缓冲液洗涤后悬浮于缓冲液中。

1.6 生物素化磁性微球同链亲和素的特异结合

取生物素化磁性微球于 1.5 ml EP 管中,用磁分离器去上清液后再悬浮;加含碱性磷酸酶标记链亲和素的大肠杆菌裂解液温和混匀;25℃ 以 250 r/min 震荡反应 30 min,磁分离去上清;加入 100 μl 碱性磷酸酶反应缓冲液和 100 μl 底物 PNPP,25℃ 震荡反应 1 h 立即加入 100 μl 浓度为 1.0 mol/L 的 NaOH 溶液终止,磁分离取上清;Biotek ELX800 酶标仪测定 405 nm 吸收。用生物素竞争结合判断特异性结合。

1.7 生物素化磁性微球同疏水性物质的非特异结合

取 200 μl 生物素化磁性微球于 0.5 ml EP 管中,磁场作用下去上清液;分别加入含 4-硝基-1-萘酚苯甲酸酯(0.25~64 $\mu\text{mol/L}$)、4-硝基苯甲酸甲酯(0.25~64 $\mu\text{mol/L}$)和色氨酸(100 $\mu\text{mol/L}$)的磷酸盐缓冲液 100 μl ,温和混匀后在 25℃ 以 250 r/min 震荡反应 30 min;磁场分离出磁性微球并尽可能分离上清液(残留量小于 10 μl)测定上清液中的未结合物质;磁性微球用 60 μl 四氢呋喃或缓冲液,在 25℃ 以 250 r/min 震荡 30 min 溶解结合的物质后测定所结合的物质。在 Agilent-1100 高效液相色谱(High performance liquid chromatography, HPLC)系统,用伊利特 ODS2 C18 柱(4.6×250 mm, 5 μm)测定这 3 种物质;所用流动相都为甲醇和水混合物,流速都是 0.8 ml/min,进样量固定在 20 μl 且柱温恒定在 25℃。分析 4-硝基-1-萘酚苯甲酸酯流动相含 90% 甲醇,检测波长 335 nm;分析 4-硝基苯甲酸甲酯流动相含 70% 甲醇,检测波长 260 nm;分析色氨酸流动相含 50% 甲醇,检测波长 280 nm。

1.8 统计分析

结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 Microsoft Excel 6.0 进行 t 检验分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PEG 不饱和酸酯包被 Fe_3O_4 纳米磁芯制备磁性微球

用一端为羟基的长链 PEG 单顺丁烯二酸单酯和一端为单甲醚的短链 PEG 丙烯酸酯,在油包水体系自由基共聚包被 Fe_3O_4 纳米磁芯获得磁性微球。用甲磺酰氯活化磁性微球表面羟基时,不用碱中和所生成酸则磁性微球会溶解而不能磁力回收;如磁芯未经 PEG 不饱和酸酯共聚包被,即使加入相同量碱,活化反应进行后磁芯也会溶解消失。可见 PEG 不饱和酸酯共聚包被纳米磁芯可增强其对酸的抗性。

用 Hitachi 7500 透射电子显微镜(Transmission electron

microscope, TEM) 观察所得 Fe_3O_4 颗粒直径在 60 nm 左右且分布范围较宽,可能是颗粒间相互作用较强生成较多团聚物所致(图 1A)。用 PEG 不饱和酯共聚包被并经生物素修饰后,颗粒直径约 200 nm(图 1B),但仍有较多团聚物,磁性微球的分散性改善不明显。

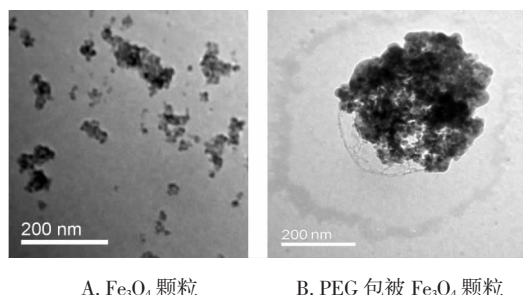
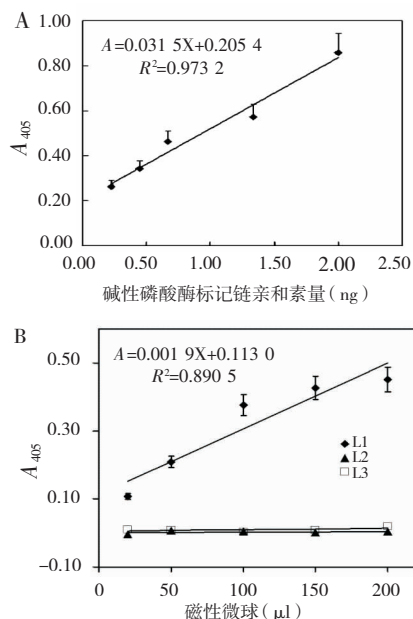


图 1 TEM 观察磁性微球

Fig.1 TEM observation of magnetic microspheres

2.2 生物素化磁性微球分离链亲和素

磁性微球对测定过氧化物酶活性有明显干扰,但对用 4-硝基苯酚磷酸酯测定碱性磷酸酶基本没有影响(数据未给);用大肠杆菌的裂解液中碱性磷酸酶标记链亲和素为待分离目标蛋白便于测定磁分离效力和特异相互作用。在所用检测体系碱性磷酸酶活性同标记链亲和素量基本成正比(图 2A)。大肠杆菌裂解液中无碱性磷酸酶标记链亲和素,则磁分离产物中无碱性磷酸酶活性。在大肠杆菌裂解液中,此生物素化磁性微球回收碱性磷酸酶标记链亲和素有明显量效关系,且可回收碱性磷酸酶标记链亲和素可被高浓度生物素所完全抑制(图 2B)。



A. 碱性磷酸酶标记链亲和素测定的响应; B. 磁性微球分离大肠杆菌裂解液中碱性磷酸酶标记链亲和素的量效关系曲线。

L1: 含 AP-SA; L2: 不含 AP-SA; L3: 同 L1 但加 4 mmol/L 生物素

图 2 碱性磷酸酶标记链亲和素同磁性微球的结合

Fig.2 Binding of streptavidin labeled by alkaline phosphatase (SP-SAV) to magnetic microspheres

据量效曲线估算,此磁性微球结合链亲和素的容量约为 51 ng 蛋白/g 磁性微球。按包被纳米磁芯时 PEG-1540 单顺丁烯二酸单酯聚合、甲磺酰氯活化、转变成氨基和生物素化修饰的效率都为 100%估算,则分布在磁性微球表面的羟基约为理论量 10^{-8} 倍。在包被 Fe_3O_4 颗粒磁芯时将所用 PEG 不饱和酯(比例固定)对纳米磁芯的比例提高 1 倍所得微球结合容量提高近 1 倍,用 N-单生物素化乙二醇与甲磺酰氯活化微球反应所得磁性微球结合容量仍无明显提高,延长甲磺酰氯活化及生物素修饰反应时间也不能提高其结合容量。

2.3 生物素化磁性微球表面的非特异性结合作用

磁性微球的多数应用要求其表面非特异性结合尽可能低,尤其用于磁分离筛选混合物组合库^[4]。疏水相互作用是磁性微球表面非特异性结合的主要驱动力,但没有报道定量测定磁性微球表面疏水性的方法。

用 Chemoffice 10.0 计算,4-硝基-1-萘酚苯甲酸酯、4-硝基苯甲酸甲酯和色氨酸疏水性(logP)分别为+3.97、+1.65和-1.07,这些化合物的疏水性覆盖了多数口服有效药物的疏水性范围,可作为模型化合物测定磁性微球表面的非特异结合作用。用 4-硝基-1-萘酚和苯甲酰氯反应制备了 4-硝基-1-萘酚苯甲酸酯;合成产物经硅胶柱纯化后,用反相 HPLC 在 240 nm 没有可检测杂质。在设定条件下,所用 HPLC 能基线分离出所结合的 3 种待测试物质。4-硝基-1-萘酚苯甲酸酯色谱峰稳定在 (6.21 ± 0.01) min($n=5$,图 3),且用色谱峰面积定量有很好线性响应。所用 HPLC 条件测定 4-硝基苯甲酸甲酯和色氨酸也有很好分辨率和线性响应。

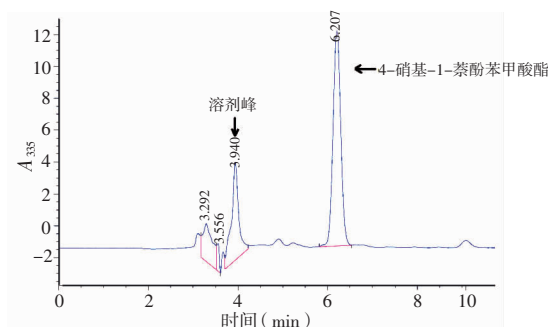


图 3 4-硝基-1-萘酚苯甲酸酯的 HPLC-UV 分析的色谱图

Fig.3 HPLC-UV analysis of 4-nitro-1-naphthol benzoate

生物素化磁性微球从测试溶液中分离出来后,可用四氢呋喃溶解出所结合的强疏水物质或用缓冲液溶解出亲水物质进行测量,但是磁分离后残留的测试溶液会造成明显本底。进行测试的 3 种物质中,只有 4-硝基-1-萘酚苯甲酸酯在很高浓度下才有可检测的结合。在低浓度范围内结合的 4-硝基-1-萘酚苯甲酸酯量同待测试物质浓度成正比,结合率维持在 12%左右且无量效关系;此结合率相对于残留测试液所得结合率为 95%可信区间。磁分离后测试溶液残留量约 10 μL ;测试体积太大则磁分离效率低且回收率低。用 100 μL 结合反应体系,以 10%作为测试液残留造成的结合率本底。独立重复测定 4-硝基-1-萘酚苯甲酸酯同磁性微球结合率的波动通常在 10%以内。4-硝基-1-萘酚苯甲酸酯在各个测试浓度下同磁性微球结合率无统计差异($P>0.05$),与本底无统

表 1 4-硝基-1-萘酚苯甲酸酯同生物素化磁性微球的结合 ($n=2$)Tab.1 Binding of 4-nitro-1-naphthol benzoate to biotinylated magnetic microspheres ($n=2$)

浓度 ($\mu\text{mol/L}$)	0.25	1.00	4.00	16.00	64.00
结合量 ($\mu\text{mol/L}$)	0.035 ± 0.002	0.130 ± 0.010	0.610 ± 0.040	2.500 ± 0.100	15.000 ± 5.000
结合率 (%)	8~20	7~19	9~21	9~21	11~35

计显著性差异(表 1)。因此,在此低浓度范围内,此磁性微球对强疏水的 4-硝基-1-萘酚苯甲酸酯没有明显的非特异结合。当待测 4-硝基-1-萘酚苯甲酸酯浓度高于 $60 \mu\text{mol/L}$ 时,结合率上升到接近 20%,但与测试溶液残留造成的本底仍无统计显著差异(表 1),这可能与重复测试数量很少有关。总体而言,此结果说明用 PEG 不饱和和酸酯自由基共聚合包被 Fe_3O_4 纳米磁芯所得磁性微球的非特异结合很低。

3 讨 论

本文中用 PEG 不饱和和酸酯自由基聚合包被磁芯时,PEG-1540 单顺丁烯二酸单酯的羟基端暴露于正庚烷相的比例、甲磺酰氯活化羟基成甲磺酸酯的效率和用乙二胺将其转变成氨基的效率、活化生物素修饰其表面氨基的效率都会影响所得磁性微球的特异结合容量。优化羟基含量、羟基活化和表面功能化过程未能有效提高其结合容量,说明 PEG-1540 单顺丁烯二酸单酯羟基端暴露于正庚烷相比例可能决定了其结合容量。用 Chemoffice 10.0 计算疏水性时分子量不能太大;PEG-400 在水-正辛醇体系分配系数 $\log P$ 接近-1.6 而正庚烷 $\log P$ 接近+3.4,按此脂水分分配系数推算,来自 PEG-400 单顺丁烯二酸单酯的羟基暴露于正庚烷中从而位于包被磁性微球表面的比例约 0.001%;PEG-1540 单顺丁烯二酸单酯羟基暴露于正庚烷相比例应该与此相当。此计算结果也支持 PEG-1540 单顺丁烯二酸单酯的羟基在正庚烷和水两相的分布比例限制了所得磁性微球的结合容量。

我们最近建立了基于磁分离筛选混合物组合库的新技术,其需非特异性结合尽可能低磁性微球^[4]。本文结果表明用 PEG 不饱和和酸酯聚合制备的磁性微球非特异性结合可忽略,但其结合容量太低。在水包油体系自由基聚合包被纳米磁芯也可制备磁性微球;在水包油体系用这类 PEG 不饱和和酸酯进行共聚合包被纳米磁芯应该能提高所得磁性微球表面的羟基密度和功能化后结合容量,同时保持所得磁性微球尽可能低非特异结合。我们用特殊不饱和和酯为单体,用水包油微乳体系聚合包被纳米磁芯,显著提高了磁性微球结合容量并保持了很低的非特异结合,数据将在后文报道。

参 考 文 献

- [1] Magnani M, Galluzzi L, Bruce L J. The use of magnetic nanoparticles in the development of new molecular detection systems[J]. *Nanosci Nanotechnol*, 2006, 6(8):2302-2311.
- [2] Horak D, Babic M, Mackova H, et al. Preparation and properties of magnetic nano- and micro-sized particles for biological and environmental separations[J]. *Sep Sci*, 2007, 30(11):1751-1772.

- [3] Choi Y, Van B R B. Development of a screening assay for ligands to the estrogen receptor based on magnetic microparticles and LC-MS[J]. *Comb Chem High Throughput Screen*, 2008, 11(1):1-6.
- [4] Yang X L, Xie Y L, Pu J, et al. Estimation of affinities of ligands in mixtures via magnetic recovery of target-ligand complexes and chromatographic analyses: chemometrics and an experimental model[J]. *BMC Biotechnol*, 2011, 11: 44.
- [5] Rattle S J, Purnell D R, Williams P I M, et al. New separation method for monodonal immunoradiometric assays and its application to assays for thyrotropin and human chorionadotropin[J]. *Clin Chem*, 1984, 30(9):1457-1461.
- [6] Popplewell J, Sakhnini L. The dependence of the physical and magnetic properties of magnetic fluids on particles size[J]. *Magn. Magn. Mater*, 1995, 149(1): 72-78.
- [7] Gupta A K, Weiis S. Surface-modified superparamagnetic nanoparticles for drug delivery: preparation, characterization, and cytotoxicity studies[J]. *IEEE Trans NanoBioSci*, 2004, 3(1): 66-73.
- [8] Khng H P, Cunliff D, Davies S, et al. The Synthesis of sub-micron magnetic particles and their use for preparative purification of proteins[J]. *Biotech Bioeng*, 1998, 60(4):419-424.
- [9] Laitinen O H, Nordlund H R, Hytönen V P, et al. Brave new(strept) avidins in biotechnology[J]. *Trends Biotechnol*, 2007, 25(6): 269-277.
- [10] Zhu S, Yang G Q, Yang X L, et al. Soluble expression in *E. coli* of active human cyclic nucleotide phosphodiesterase isoform 4B2 in fusion with maltose-binding-protein[J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2009, 73(4):968-970.
- [11] 陈亨汝, 孙 瑾. Fe_3O_4 磁性纳米粒子的共沉淀法制备研究[J]. *应用化学*, 2009, 38(2):226-228.
- [12] Chen T R, Sun J. Study on preparation of magnetic Fe_3O_4 nanoparticles via the chemical co-precipitation method[J]. *Applied Chemical Industry*, 2009, 38(2):226-228.
- [13] 张夏虹, 陈 龙, 李 超, 等. 傅立叶变换红外光谱法研究马来酸酐与聚乙二醇酯化反应[J]. *广东化工*, 2008, 35(2):69-70.
- [14] Zhang X H, Chen L, Li C, et al. Study on esterification between maleic anhydride and polyethylene glycol with FTIR[J]. *Guangdong Chemical Industry*, 2008, 35(2):69-70.
- [15] Fishman A, Farrah M E, Zhong J H, et al. Synthesis and investigation of novel branched PEG-Based soluble polymer supports[J]. *Org. Chem*, 2003, 68(25):9843-9846.
- [16] Ge J P, Hu Y X, Biasini M, et al. One-step synthesis of highly water-soluble magetite colloidal nanocrystals[J]. *Chem Eur J*, 2007, 13(25): 7153-7161.
- [17] Liao F, Xie Y, Yang X, et al. Homogeneous noncompetitive assay of protein via Förster-resonance-energy-transfer with tryptophan residue(s) as intrinsic donor(s) and fluorescent ligand as acceptor[J]. *Biosens Bioelectron*, 2009, 25(1):112-117.

(责任编辑:关蕴良)