

SPR 生物传感技术在农产品安全检测中的应用

王婷婷^{1,2}, 胡建东²

(¹河南农大迅捷测试技术有限公司, 郑州 450002; ²河南农业大学机电工程学院, 郑州 450002)

摘要:表面等离子共振作为近几年在国内发展起来的一种检测技术,具备检测样品用量少、灵敏度高、检测速度快等优点,已被用于环境检测、医疗诊断、药物筛选、蛋白质组学、基因组学等诸多领域。随着技术的发展,广大学者将其与生物技术结合起来,在传感芯片表面修饰不同的特异性抗原抗体及信号放大因子,将表面等离子共振技术不断应用到农产品安全的检测中。通过介绍该技术在农产品中农残药残、动物疾病、微生物、食品添加剂、重金属及转基因检测的应用情况,以期使读者深入了解表面等离子共振技术在食品安全检测的发展现状,为其在该领域的进一步发展提供可以借鉴的资料。

关键词:表面等离子共振;生物传感;农产品安全;检测;应用

中图分类号:R155.5

文献标志码:A

论文编号:casb18110039

Applications of SPR Biosensing Technology in Agricultural Products Safety Detection

Wang Tingting^{1,2}, Hu Jiandong²

(¹Henan Nongda Xunjie Measurement Technology Co., Ltd, Zhengzhou 450002;

²Department of Electrical Engineering, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002)

Abstract: Surface plasmon resonance (SPR) as a novel technology has advantages of small sample volumes, high sensitivity and fast detection speed, which is widely applied in environmental detection, medical diagnosis, drug screening, proteomics, genomics and many other fields. With its development, SPR is combined with biotechnology, then modified by specific antigen, antibody and signal amplification factor, and widely used in safety detection of agricultural products. The paper introduces the application of SPR in detection of pesticide and medicine residues, animal disease, microbe, food additives, heavy metal and transgenic test in agricultural products. The study could provide certain references for understanding the development status of SPR in food safety test.

Keywords: surface plasmon resonance; biosensing; agricultural products safety; detection; application

0 引言

进入21世纪以来,“毒大葱”、“毒大米”等多次恶性食品安全事件的发生,促使广大人民群众越来越关注餐桌安全,并由此成为全社会关注的焦点。2014年以来国家食品药品监管总局,农业部落实习近平总书记“四个最严”要求,展开全国食品安全示范城市创建与农产品质量安全县创建的“双安双创”活动,加大市

场监管,从源头杜绝不安全因素。2017年第四季度国家食品药品监督管理总局食品安全抽查,不合格样品23766批次,占总提抽查样本的2.2%。其中,食品中超范围、超限量使用食品添加剂问题占不合格总数的27.7%;食品中农兽药残留指标不合格问题占不合格总数的25.1%;食品中微生物污染问题占不合格总数的24.4%;食品中重金属等元素污染问题占不合格总

基金项目:国家重点研发计划“土壤生物有效态氮磷原位提取及检测设备研发与标准研制”(2017YFD0801204);河南省自然科学基金“植物胁迫激素脱落酸光谱检测新技术研究”(162300410143);郑州市第三批“智慧郑州·1125聚才计划”项目“便携式金标判读仪的研究与开发”(郑政[2018]45号);郑州市工程技术研究中心“郑州市农业检测工程技术研究中心”(郑科[2017]91号)。

第一作者简介:王婷婷,女,1984年出生,河南商丘人,中级,硕士,主要从事SPR技术分析测试方法研究。通信地址:450002 河南农大迅捷测试技术有限公司, Tel:0371-55611860, E-mail:ting.moon.w@163.com。

通讯作者:胡建东,男,1965年出生,江西新余人,教授,博士,主要从事光及电磁波在农业生物测试中的应用研究。通信地址:450002 河南农业大学机电工程学院, Tel:0371-63558280, E-mail:jiandonghu@163.com。

收稿日期:2018-11-12, **修回日期:**2019-01-18。

数的3.3%;食品中生物毒素污染问题占不合格总数的1.2%,除此之外还有生物毒素、质量指标的不合格。如何才能吃的放心,吃得安心?除了要从源头抓起,食品的安全性检测也是必不可少的手段之一。目前用于农产品安全检测的技术主要有光谱技术^[1]、色谱技术^[2-4]、生物技术^[5]以及微生物培养^[6]等方法。而光学表面等离子共振(Surface Plasmon Resonance, SPR)现象首次报道在20世纪初,其作为一种检测方法最早用于检测气体CO₂及O₂的浓度^[7]。随着该技术的不断发展,将其与生物技术结合,形成SPR生物传感器,可以检测所有的具有特异性反应的生物分子。因此,SPR技术越来越显示出其重要的应用价值,并越来越多的参与到农产品安全性的评价工作中^[8-9]。

1 SPR原理及引入

表面等离子共振作为一种物理光学现象,最早提出于1902年^[10]。其基本原理是当一束P偏振光以一定

角度入射到棱镜端面,在金膜与介质界面产生表面等离子波,当入射光波波向量的水平分量和表面等离子体的振动波向量相等时,就会产生表面等离子体谐振。共振时,入射光能量将部分转移到表面等离子体上,使相应的反射光光强减至最弱(图1)。1983年Liedberg等^[11]利用表面等离子共振技术研究抗原抗体之间的相互作用,首次将SPR技术应用于生物化学检测。由于SPR技术具有诸多优点,如检测样品用量少、灵敏度高、检测速度快,已被广泛用于环境检测^[12]、医疗诊断^[13]、药物筛选^[14]、蛋白质组学^[15]、基因组学^[16]等诸多领域。本文将系统综述SPR技术在农产品安全检测的应用现状,以期为保障餐桌安全提供一种新的思路。

2 SPR技术在农产品安全检测中的应用

2.1 SPR技术在农产品中农残药残检测中的应用

农产品中的农药残留主要指抗生素、杀虫剂类、生

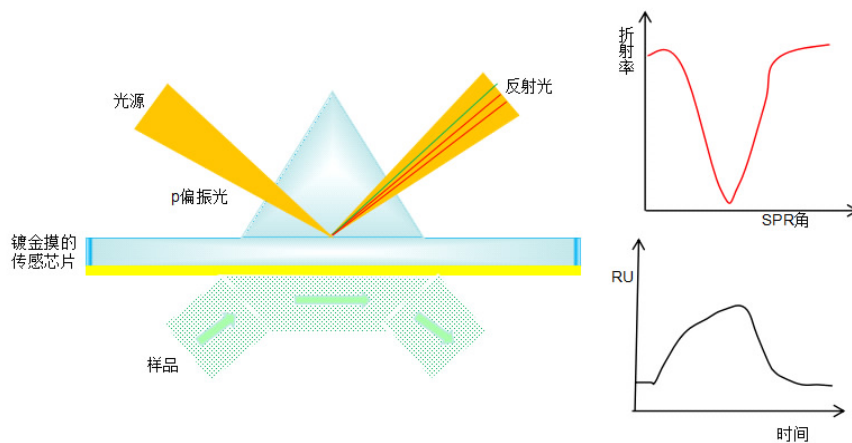


图1 SPR检测原理

长促进剂等。长期使用含有农药残留的农产品对人体健康构成严重威胁。用抗体作为识别分子,检测农药是目前世界上应用最广、最普遍的检测方法。随着科技的发展,抗原抗体的特异性结合通过SPR技术越来越广泛的应用到药物残留的检测,并且其检测限不断降低,检测范围不断增大。Hu^[17]将盐酸克伦特罗抗体通过化学方法固定在传感金膜表面,捕捉流经的盐酸克伦特罗抗原,抗原抗体特异性结合,引起金膜表面物质的量的变化及折射率的改变,通过计算响应值(response unit, RU)的变化确定溶液中盐酸克伦特罗的浓度(图2)。研究绘制了盐酸克伦特罗检测的标准曲线,检测限为1.26 ng/mL。石婷等^[18]依据抗原抗体反应,通过自组装在金膜表面固定生物分子,用于检测不

同质量浓度的氨苄青霉素,最低分辨浓度为1.25 ng/mL。同时分析了样品流速、温度、pH值、离子浓度对检测结果的影响。

随着电化学技术及分子印迹技术(Molecular imprinted polymers, MIP)的发展,1998年,Lai等^[19]制备出茶碱、黄嘌呤和咖啡MIP-SPR传感器,并首次进行物质检测分析,结果表明该MIP-SPR传感器满足与待测待分析物质的特异性结合,检测限为0.4 mg/mL。自此,MIP-SPR技术在农药、兽药、生物毒素等领域的应用取得了较好发展。2016年,Shrivastav等^[20]将银镀在多模光纤上,然后在银膜表层涂上针对于丙溴磷的分子印迹聚合物,制备了一种新型的基于光纤及生物分子印迹聚合物的SPR生物传感器,当丙溴磷引入

时,可与分子印迹聚合物结合,被检物质折射率改变,SPR可以快速准确的捕捉到这种变化,并区分不同浓度的靶标物质。经验证该传感器对丙溴磷的检测其 LOD 值可达到 $2.5 \times 10^{-6} \mu\text{g/L}$,检测范围为 $10^{-4} \sim 10^{-1} \mu\text{g/L}$ 。Zhang等^[21]制备的卡那霉素分子印迹SPR传感器,对卡那霉素的线性检测范围为 $1.0 \times 10^{-7} \sim 1.0 \times 10^{-8} \text{ mol/L}$,对蜂蜜中卡那霉素的检测限达到 $1.20 \times 10^{-8} \text{ mol/L}$ 。

SPR技术是依靠生物分子膜上物质质量的变化来检测物质的,而几乎所有的农药都是小分子物质,直接检测过程中物质质量变化不明显,限制了SPR技术在

农药残留检测中的应用。近年来不断有学者通过信号放大实现检测小分子物质^[22-24],扩大被检物质的检测范围。Bianco M将特定序列的双链DNA适配体经巯基修饰后,通过自组装单层膜形式固定在传感金膜表面,用于检测真菌代谢物赭曲霉毒素,检测限为 0.005 ng/mL ^[25]。Wang等^[26]运用Biacore T200,在已标记有生物素的CM5芯片表面通过在DNA纳米结构的四面体上定向固化四环素抗体适配体(Apt76),来提高SPR适配体传感器的芯片灵敏度及特异性。实测中,蜂蜜中四环素检测的回收率为 $80.20\% \sim 114.3\%$,最低检

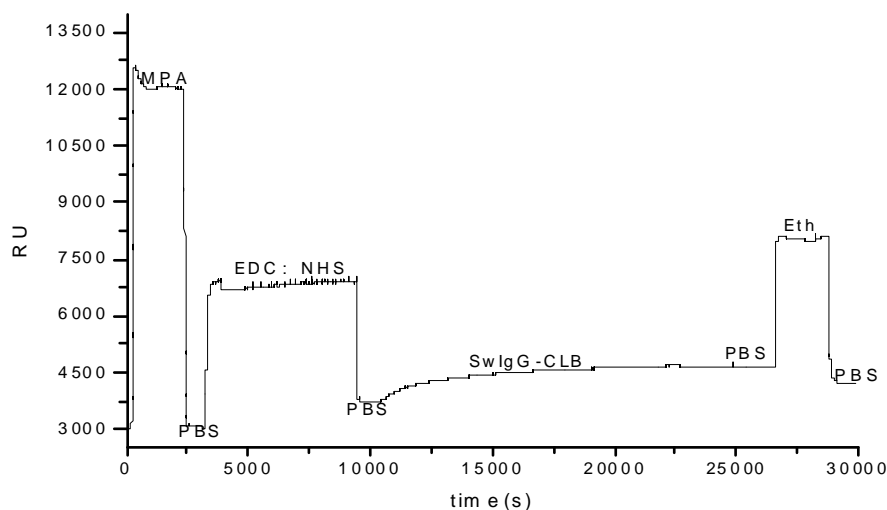


图2 SPR检测盐酸克伦特罗的响应过程^[17]

测限为 $0.0069 \mu\text{g/kg}$ 。

2.2 SPR技术在动物疾病及微生物检测中的应用

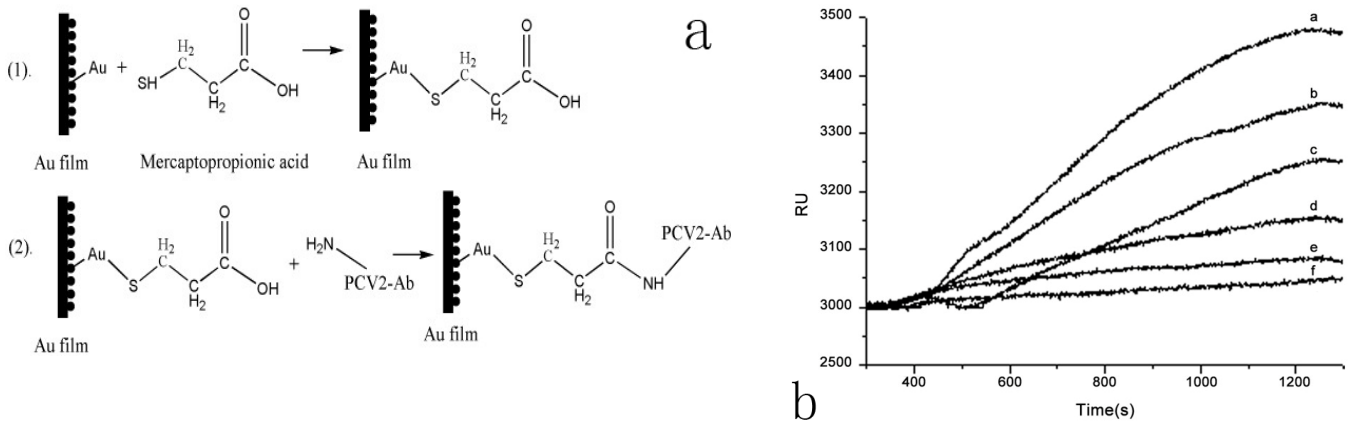
传统的动物疫病检测方法往往具有耗时、灵敏度低、假阳性高以及易受干扰等缺点,难以用于大范围快速准确地检测动物病毒^[27]。SPR生物传感器的发展为SPR技术应用于动物疾病检测提供了先决条件。2012年,Hu^[28]在自行设计研制的SPR生物分析系统中首次对鸡法氏囊病毒进行检测,通过倍比稀释,各稀释倍数 Δ RU响应值相关系数达到0.97982,同一稀释倍数经多次重述测试,相对标准偏差(RSD)为3.6%,最低检测限为 2.5 ng/mL 。2014年Hu^[29]通过自组装分子膜又对猪圆环病毒II (Porcine circovirus II, PCV2)型进行检测(图3),检测限达到 0.04 mg/mL ,通过样品添加进行回收率试验,回收率范围为 $81.0\% \sim 89.3\%$ 。

中国每年因食用含有致病菌的农产品而引起的食物中毒事件占总数的 $30\% \sim 90\%$,利用SPR技术对细

菌、真菌的检测近几年发展较快,灵敏度也不短得到突破。2013年Wang提出基于消减抑制原理的O157:H7,有效地避免了因细菌体积过大而超过有效检测范围的缺点提高了对大肠杆菌检测的灵敏度^[30]。Naboka等^[31]将全内反射椭圆光度法(total internal reflection ellipsometry, TIRE)与LSPR联用,克服了LSPR的隐失场衰减长度的缺点,将霉菌毒素的检测灵敏度提高到 0.1 ng/mL 。

2.3 SPR技术在农产品添加剂检测中的应用

食品添加剂的诞生一方面大大促进了食品工业的发展,并被誉为现代食品工业的灵魂,但与此同时由于一些不良商家的非法或过度添加,致使有食品添加剂引起的食品安全问题被频频爆出。食品添加剂的检测方法近几年也在不断摸索中得到较快发展,表面等离子共振技术以其高灵敏度的性能备受喜爱。周春燕等^[32]通过表面引发聚合技术在SPR传感芯片表面



a~g 的 PCV2 浓度分别为 10.0、7.5、5.0、2.5、1.0、0.5 mg/mL
图 3 a 检测猪圆环病毒 II 型的自组装分子识别膜; **b** 不同浓度病毒的检测响应曲线^[29]

固定一层苏丹红 I 印迹凝胶膜,用于检测辣椒粉和腌制品中的苏丹红 I (如图 4),其检出限分别为 3.4×10^{-10} mol/L 和 2.5×10^{-10} mol/L。王曼丽等^[33]建立的傅里叶-表面等离子共振传感器用于检测柠檬黄,检出限 13 μ g/L。研究中作者首先将柠檬黄与牛血清蛋白耦合,然后将偶合物通过物理方法固定在 SPR 传感金膜表面,检测时现将柠檬黄溶液与柠檬黄-小鼠单克隆抗

体混合,反应充分后,将反应液流经制备好的芯片,芯片上固定的柠檬黄-牛血清蛋白就会捕捉到多余的未反应的柠檬黄-小鼠单克隆抗体,通过竞争法实现检测柠檬黄。

2.4 SPR 技术在重金属检测中的应用

关于重金属污染事件屡见不鲜,从湖南儿童血铅超标事件,到重金属污染“菜篮子”等等,可见重金属污

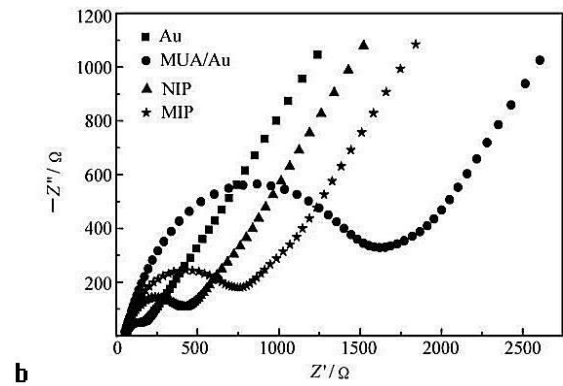
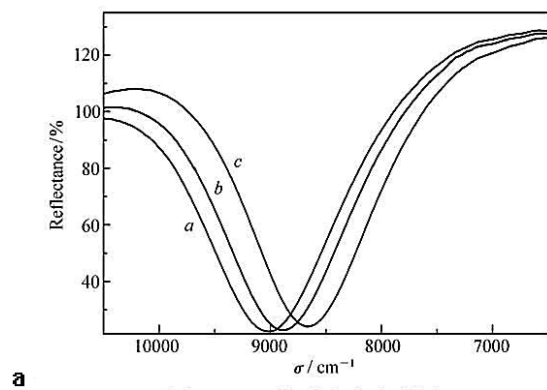


图 4 a 检测辣椒粉和腌制品中的苏丹红 I 的 SPR 传感芯片光谱图; **b** 检测辣椒粉和腌制品中的苏丹红 I 的 Au、NIP、MIP 及 MUA/Au 的阻抗图谱^[32]

染已影响到我们的健康生活。重金属是指密度大于 4.5 g/cm^3 的金属,常见的有 As、Hg、Pb、Cd、Gr、Ag、Ni、Cu、Au 等共计 45 种。提高农产品中重金属的检测技术水平、解决农产品中重金属超标问题,对加强农产品原材料及成品污染的监控具有重要意义。国内外学者在不断完善现有检测方的同时,也引入了新的技术。Pang 等^[34]通过自制的金银复合膜-SPR 进行重金属镉离子(Cd^{2+})的检测。首先在玻璃上镀上 2 nm 厚度的铬(Cr)层作为黏附层,然后蒸镀一层 40 nm 后的银膜,最

后是 10 nm 的金膜,完成复合膜制备,然后将牛血清蛋白(BSA)直接生长在金膜表面,用于检测 Cd^{2+} 。经测试该金银复合膜-SPR 最低检测值为 $0.01 \mu\text{M}$ (如图 5)。Pelosof 等^[35]利用氯高铁血红素及带有 DNA 酶的 Pb^{2+} 提高 SPR 的灵敏度,对 Pb^{2+} 的检测限分别为 1×10^{-12} mol/L 和 5×10^{-15} mol/L。

2.5 SPR 技术在转基因农产品检测中的应用

近几年转基因产品被推上了食品安全的风口浪尖,而如何检测转基因食品也成为广大消费者关心的

热点。目前,针对转基因的检测主要有基于蛋白质的检测方法和基于DNA的检测技术两种。利用SPR技术进行转基因片段的研究还不多见。2009年肖守斌^[36]将带巯基头的35S启动子寡聚核苷酸探针修饰到镀金的Biacore芯片表面,检测了玉米中的转基因PCR扩增

片段。2013年,王婷婷等^[37]利用SPR技术检测小麦中的一段转基因序列,比PCR电泳检出值低1倍,且检测线为0.27 mg/L(图6)。随着SPR技术对基因片段转录蛋白质研究的不断深入,也为转基因食品的检测提供了一种思路。

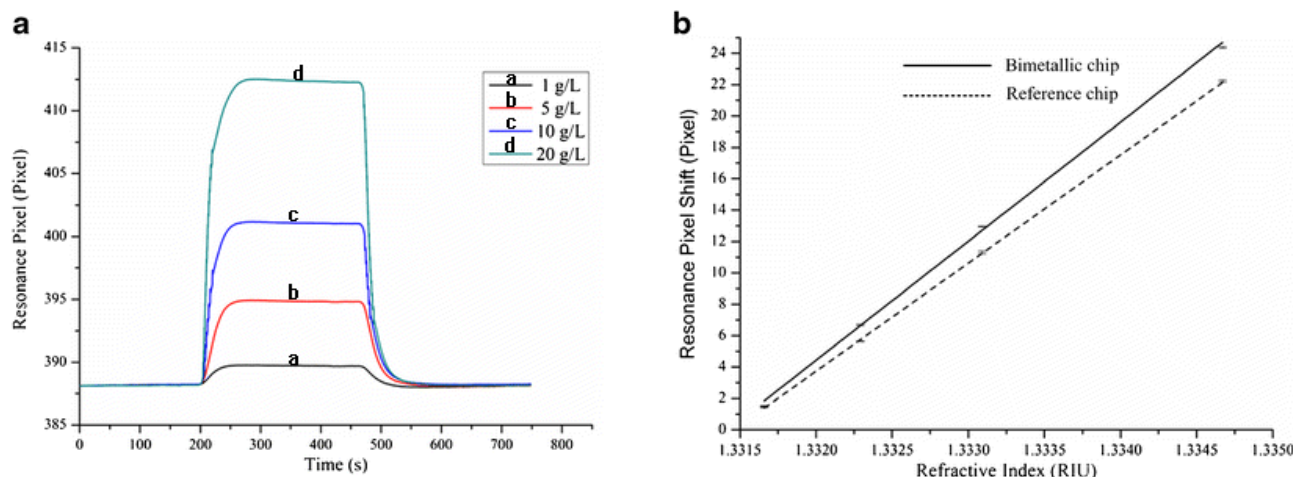
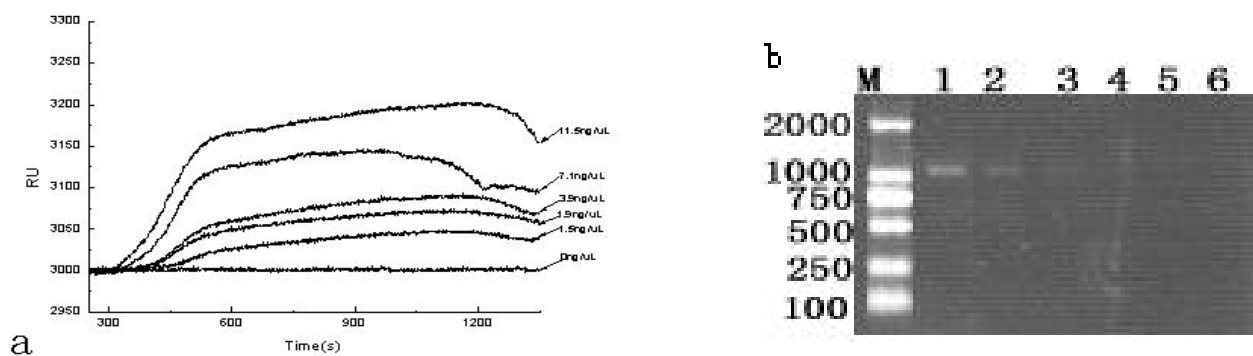


图5 a不同浓度的氯化钠溶液在金银复合膜的传感图;b检测不同折射率的氯化钠溶液的计算曲线^[34]



M. DNA marker; 1~5 样品质量浓度分别为 11.5、7.1、3.9、1.9、1.5 mg/L; 6. 空白对照
图6 a不同浓度转基因片段的SPR响应曲线;b不同浓度转基因片段的PCR电泳结果^[37]

3 结论

SPR技术作为一种检测手段,近几年在国内外发展的如火如荼。纵向上不断挖掘SPR技术的在检测上的灵敏度及检测限,横向上SPR的应用领域不断扩大,如医疗、环境、蛋白质及基因组学、食品安全等。但我们也不可回避的是SPR技术也有自身的缺陷。例如小分子的灵敏度有待提高、设备昂贵等。于是SPR技术与其他技术的联用也就应运而生,如LSPR^[38]、分子印迹SPR^[19-21]、电化学SPR^[39]、磁光SPR^[40]、光子晶体光纤SPR^[41]、SERS-SPR技术的联用^[42]等等。相信这一

技术的不断发展将为其在食品安全检测上的应用提供更为有力的条件。

参考文献

- [1] 徐霞,成芳,应义斌. 近红外光谱技术在肉品检测中的应用和研究进展[J]. 光谱学与光谱分析, 2009, 29(7): 1876-1880.
- [2] 傅若农. 近几年国内外气相色谱固定相的进展[J]. 分析实验室, 2013, 32(5): 111-124.
- [3] Wang Q J, Yi R H, Mo C H. Determination of Quinolone Antibiotics in Water Using Solid Phase Extraction- High Performance Liquid Chromatography- Fluorescence Method[J].

- Animal Husbandry and Feed Science,2011,3(2):45-48.
- [4] Choma I, Grenda D, Malinowska I, et al. Determination of flumequine and doxycycline in milk by a simple thin-layer chromatographic method[J]. *J Chromatogr B*,1999,734(1):7-14.
- [5] 王磊,张丽杰,吕伟,等. 生物素-亲和素放大酶联免疫吸附法测定二乙基磷酸酯类有机磷农药[J]. *分析化学*,2011,39(3):346-350.
- [6] 杨丽. 食品污染物检测技术研究进展与食品安全检测方法标准研究[J]. *中国食物与营养*,2005,3:31-33.
- [7] Homola J, Yee S S, Gauglitz G. Surface plasmon resonance sensors: review[J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*,1999,54(1-2):3-15.
- [8] Rasooly A. Surface Plasmon Resonance Analysis of Staphylococcal Enterotoxin B in Food[J]. *Journal of Food Protection*,2001,64(1):37-43.
- [9] Mifumi S, Yoko N, Zhang W, et al. Simple and rapid detection method using surface plasmon resonance for dioxins, polychlorinated biphenylx and atrazine[J]. *Analytica Chimica Acta*,2001,434(2):223-230.
- [10] 黄智伟,黄琛. 表面等离子体共振生物传感器的研究现状[J]. *传感器世界*,2001,7(5):8-12.
- [11] Liedberg B, Nylander C, Lundstrom I. Surface plasmon resonance or gas detection and biosensing[J]. *Sensors & Actuators*,1983,4:299-304.
- [12] Inamori K, Kyo M, Nishiya Y, et al. Detection and quantification of on-chip phosphorylated peptides by surface plasmon resonance imaging techniques using a phosphate capture molecule[J]. *Analytical Chemistry*,2005,77(13):3979-3985.
- [13] Chen C Y, Baker S, Darton R. The application of a high throughput analysis method for the screening of potential biosurfactants from natural sources[J]. *Journal of Microbiological Methods*,2007,70(3):503-511.
- [14] Altintas Z, Uludag Y, Gurbuz Y, et al. Development of surface chemistry for surface plasmon resonance based sensors for the detection of proteins and DNA molecules[J]. *Analytica Chimica Acta*,2012,7(12):138-144.
- [15] Liu X. Performance Improvement for the Wavelength Modulation Surface Plasmon Resonance and Its Application[D]. Changchun: Jilin University,2006.
- [16] 鲍蕾,许艳丽,梁成珠,等. 表面等离子共振生物传感器在食品检测中的应用[J]. *检验检疫学刊*,2012,22(4):73-76.
- [17] Hu J D, Chen R P, Wang S, et al. Detection of Clenbuterol Hydrochloride Residuals in Pork Liver Using a Customized Surface Plasmon Resonance Bioanalyzer[J/OL]. *PLOS ONE*,2015,10(3):e0122005.
- [18] 石婷,刘瑾,张婉洁,等. 基于SPR生物传感器的抗生素残留检测及影响因素分析[J]. *天津大学学报*,2010,43(3):255-261.
- [19] Edward L, Fafara A, Vandermoot V, et al. Surface plasmon resonance sensors using molecularly imprinted polymers for sorbent assay of theophylline, caffeine, and xanthine[J]. *Canadian Journal of Chemistry*,1998,76(3):265-273.
- [20] Anand S, Usha S, Gupta B. Fiber optic profenofos sensor based on surface plasmon resonance technique and molecular imprinting[J]. *Biosensors and Bioelectronics*,2016,5(79):150-157.
- [21] Zhang L L, Zhu C C, Chen C B, et al. Determination of kanamycin using a molecularly imprinted SPR sensor[J]. *Food Chemistry*,2018,266(15):170-174.
- [22] LonL A, Musiek M. D, Natan M. J. Colloidal Au-Enhanced surface plasmon resonance immunosensing[J]. *Analytical Chemistry*,1998,70(24):5177-5183.
- [23] Lee W, Son T, Lee C, et al. Ultra-Sensitive Surface Plasmon Resonance Detection by Colocalized 3D Plasmonic Nanogap Arrays [J]. *Biosensors and Biodetection*,2017,3:15-29.
- [24] Lee S J, Youn B S, Park J W, et al. SSDNA aptamer-based surface plasmon resonance biosensor for the detection of retinol binding protein 4 for the early diagnosis of type 2 diabetes[J]. *Analytical Chemistry*,2008,80(8):2867-2873.
- [25] Bianco M, Sonato A, De Girolamo A, et al. An aptamer-based SPR-polarization platform for high sensitive OTA detection[J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*,2017,3(241):314-320.
- [26] Wang S, Dong Y Y, Liang X G. Development of a SPR aptasensor containing oriented aptamer for direct capture and detection of tetracycline in multiple honey samples[J]. *Biosensors and Bioelectronics*,2018,109:1-7.
- [27] 邵康,聂阿秀,韩鹤友. 动物重大疾病的光电传感技术新进展[J]. *分析科学学报*,2017,33(5):729-735.
- [28] Hu J D, Li W, Wang T T, et al. Development of a label-free and innovative approach based on surface plasmon resonance biosensor for on-site detection of infectious bursal disease virus (IBDV) [J]. *Biosensors and Bioelectronics*,2012,31(1):475-479.
- [29] Hu J D, Wang T T, Wang S, et al. Development of a surface plasmon resonance biosensing approach for the rapid detection of Porcine Circovirus Type2 in sample solutions[J/OL]. *PLOS ONE*,2014,9(10):e111292.
- [30] Wang Y X, Ye Z Z, Si C Y, et al. Subtractive Inhibition Assay for the Detection of E.coli O157:H7 Using Surface Plasmon Resonance [J]. *Sensors*,2013,11(3):2728-39.
- [31] Naboka A, Al-Rubaye A G, Al-Jawdah AM, et al. Novel optical biosensing technologies for detection of Mycotoxins[J]. *Optics and Laser Technology*,2019,109:212-221.
- [32] 周春燕,陈长宝,李洁,等. 苏丹红 I 印迹表面等离子共振传感器的制备与表征[J]. *应用化学*,2014,31(19):1107-1114.
- [33] 王曼丽,明华蜜,尹洪宗,等. 表面等离子体共振生物传感器的构建及对柠檬黄的检测[J]. *分析化学研究报告*,2014,42(1):53-58.
- [34] Pang K, Dong W, Zhang B, et al. A Performance-Enhanced Bimetallic Chip for the Detection of Cadmium Ions with Surface Plasmon Resonance[J]. *Plasmonics*,2016,11(4):1119-1128.
- [35] Pelossof G, Telvered R, Willner I. Amplified surface plasmon resonance and electrochemical detection of Pb²⁺ ions using the Pb²⁺-dependent DNAzyme and hemin/G-quadruplex as a label[J]. *Analytical Chemistry*,2012,84(8):3703-3709.
- [36] 肖守斌. 运用表面等离子共振(SPR)生物传感器检测转基因玉米的研究[J]. *玉米科学*,2009,17(2):38-43.
- [37] 王婷婷,李伟,魏文松,等. 光学表面等离子共振生物传感器检测小麦转基因的研究[J]. *河南农业大学学报*,2013,47(5):580-583.

-
- [38] Nasrin F, Chowdhury A D, Takemura K, et al. Single-step detection of norovirus tuning localized surface plasmon resonance- induced optical signal between gold nanoparticles and quantum dots[J]. *Biosens Bioelectron*,2018,30(122):16-24.
- [39] Chiu N F, Yang C D, Chen C C, et al. Stepwise control of reduction of graphene oxide and quantitative real-time evaluation of residual oxygen content using EC- SPR for a label- free electrochemical immunosensor[J].*Sensors and Actuators B*,2018,258:981-990.
- [40] Otipka P, Vlče J, Leňák M, et al. Design of MO- SPR sensor element with photonic crystal[J].*Photonics and Nanostructures- Fundamentals and Applications*,2018,31:77-80.
- [41] Liu H, Wang M, Wang Q, et al. Simultaneous measurement of hydrogen and methane based on PCF-SPRstructure with compound film-coated side-holes[J].*Optical Fiber Technology*,2018,45:1-7.
- [42] Meyer Stefan A, Auguié B, Le Ru Eric C, et al. Combined SPR and SERS microscopy in the Kretschmann configuration[J].*Journal of Physics*,2012,116(3):1000-1007.