

采用抗体包被纳米金多层自组装膜的 HCG 安培免疫传感器

干宁¹, 倪敏君², 郑磊³, 王峰¹, 李天华¹

(1. 新型功能材料及其制备科学国家重点实验室, 宁波大学材料科学与化学工程学院, 315211, 浙江宁波;
2. 宁波口岸医院检验科, 315051, 浙江宁波; 3. 南方医院检验科, 510000, 广州)

摘要: 研制了一种采用人绒毛膜促性腺激素抗体(anti-HCG)包被巯基丁二酰胺(HL)/纳米金(AuNPs)多层膜修饰金电极的免疫传感器(Au|{HL/AuNPs}_n-anti-HCG),用于检测人唾液中的HCG. 通过层层自组装技术在Au电极表面交替修饰多层{HL/AuNPs}_n膜,再通过膜内的AuNPs吸附anti-HCG,构筑了HCG安培免疫传感器. 以K₃Fe(CN)₆为探针,在pH 7.0的PBS缓冲液中加入HCG,随着HCG与电极表面anti-HCG发生特异性免疫反应,形成的抗原/抗体免疫复合物使得K₃Fe(CN)₆在电极表面的响应电流减小,减小量(I_p)与膜表面的免疫反应程度相关,以此作为HCG定量的依据. 对各修饰电极表面进行了表征和定量分析. 实验表明:该免疫传感电极中{HL/AuNPs}_n膜内存在的大量AuNPs显著增加了anti-HCG吸附量,从而使得其HCG检测范围变宽(0.1~100 mg/L),检出下限为0.056 mg/L(3 σ).

关键词: 层层自组装;纳米金胶;巯基丁二酰胺;人绒毛膜促性腺激素;安培免疫传感器

中图分类号: O657.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-987X(2010)07-0114-06

Amperometric Immunosensor for Human Chorionic Gonadotrophin Based on Antibody Coated Nano Gold Multilayer Modified Electrode

GAN Ning¹, NI Minjun², ZHENG Lei³, WANG Feng¹, LI Tianhua¹

(1. The State Key Laboratory Base of Novel Functional Materials and Preparation Science, Ningbo University, Ningbo, Zhejiang 315211, China; 2. Clinical Laboratory of Ningbo Export Hospital, Ningbo, Zhejiang 315051, China; 3. Clinical Laboratory of Nanfang Hospital, Guangzhou 510000, China)

Abstract: An amperometric immunosensor for human chorionic gonadotrophin (HCG) in the saliva is developed based on HCG antibody(anti-HCG) coated mercapto succinic amide (HL)/gold nanoparticles(AuNPs) multilayer membrane modified Au electrode. HL/AuNPs monolayers are modified alternatively and form multiple membranes through Au-NH₂ and Au-S bonds by layer-by-layer self-assembly technology. K₃Fe(CN)₆ is employed as electron probe for detection. The antigen-antibody immune complex formed on the electrode surface is able to hinder electron transport, so the redox current of K₃Fe(CN)₆ is decreased. The decreased value of ΔI_p is related to the extent of immune-reaction on membrane surface, which serves as the quantitative basis of HCG content. The experimental results show that multilayer AuNPs membrane can adsorb more anti-HCG, and obviously broaden the linear detection range of HCG to 0.1-100 mg/L with detection limit of 0.056 mg/L (3 σ).

Keywords: layer-by-layer self assembly; nano gold colloid; mercapto succinic amide; human chorionic gonadotrophin; amperometric immunosensor

人绒毛膜促性腺激素(HCG)是诊断早孕和肝癌等恶性肿瘤的重要生物标志物^[1]。目前,检测HCG常用的方法主要有免疫放射法和酶联免疫吸附法等。这些方法虽然结果可靠,灵敏度高,但通常采用血液样品,取血量较大(> 5 mL),容易给患者带来一定的精神压力^[2]。唾液的成分与血液成分极其相似,且由于唾液的采样较血液采样容易得多,故用唾液代替血清对HCG进行测定将减少对病人的伤害。然而,唾液中的HCG含量一般较血清中的含量低10~100倍,浓度约在0.1~5 mg/L范围内^[3],因此,若要对唾液中的痕量HCG进行适时检测,必须建立一种灵敏度高且快速准确的免疫分析方法。电化学免疫分析结合了电化学的高灵敏度和免疫分析的高特异性,有望达到这种要求^[4]。近年来,基于纳米金(AuNPs)固定HCG抗体功能膜构建的安培传感器由于具有良好的生物相容性和电信号表面增强效应,越来越受到人们的青睐。构建该类传感器的技术关键是使抗体包被的纳米金稳定地固定在电极表面,目前多采用基于溶胶凝胶的方法,如Chen等人采用胶体金纳米粒子/二氧化钛溶胶-凝胶复合膜^[5]和三维纳米金溶胶凝胶^[6]制备了HCG免疫传感器。然而,上述方法属于物理吸附,抗体包被AuNPs在凝胶网络中容易脱落,由此使电极检测HCG的灵敏度受到限制,且电极寿命不长。层层组装是近10年来发展起来的一种构筑有序超薄膜修饰电极的方法,它依靠2种组分间的特定作用力将其交替组装到电极表面形成多层膜,其膜组成、层数和厚度均可相当精确地加以控制^[7]。自组装是制备单分子有序膜(SAMs)修饰电极的一种有效技术,被修饰分子能通过化学键作用自发吸附在电极界面上,形成热力学稳定且能量最低的有序膜,制作方便简单^[8],其中氨基可以与Au微粒形成稳定的Au-NH₂自组装键。为此,本文利用AuNPs和巯基丁二酰胺(HL)之间形成Au-NH₂键的原理,将HL、AuNPs交替层层自组装到金电极表面,进而在其表面固定anti-HCG,构建多层anti-HCG包被{HL/AuNPs}_n(*n*为修饰层数)膜的安培免疫传感器。

1 实验部分

1.1 仪器和试剂

实验仪器包括:CHI-660B电化学工作站(上海辰华);三电极体系(免疫电极为工作电极,铂片电极为辅助电极,饱和甘汞电极(SCE)为参比电极);S-

3400N型扫描电子显微镜(日本日立公司);S2 Ranger型X射线荧光光谱仪(德国Bruker公司);EasySizer20型激光粒度仪(美国欧美科公司)。

实验试剂包括:巯基丁二酰胺,柠檬酸三钠,氯金酸,牛血清蛋白(BSA),均购自上海国药公司;HCG试剂盒(包括不同浓度的HCG及其抗体,美国ADL公司);10份不同HCG感染度的唾液(南方医科大学检验科)。所有试剂均为分析纯,试验用水均为超纯水。

1.2 Au|{HL/AuNPs}_n-anti-HCG免疫电极的制备和表征

(1)纳米金胶的合成。按照文献[8]的方法,采用柠檬酸三钠法制备粒径为30~50 nm的纳米金胶。

(2)免疫传感电极的制备。将直径为2 mm的金电极抛光处理^[9]后,浸泡在0.1 mmol/L的巯基丁二酰胺(HL)水溶液中12 h,然后继续浸泡在1 mg/L的AuNPs溶液中12 h,形成第一层纳米金层(见图1b)。如此将电极交替浸泡在HL和AuNPs溶液中,可在电极表面形成{HL/AuNPs}_n多层膜,进而将其浸泡在anti-HCG溶液中12 h以固定抗体,并用BSA封闭AuNPs多余位点,即得免疫传感电极(修饰过程见图1)。

(3)修饰电极的表征。采用扫描电子显微镜对电极表面进行表征。图2a~2c显示了修饰不同层数{HL/AuNPs}电极的表面形貌。由图2a可见,Au|{HL/AuNPs}电极表面分散有一些30~50 nm直径的纳米金颗粒;由图2b可见,Au|{HL/AuNPs}₂电极表面的纳米金分布更密集且均匀;由图2c可见,Au|{HL/AuNPs}₃电极表面的纳米金分布更加密集,但排列松散,堆砌成团;由图2d可见,Au|{HL/AuNPs}₂-anti-HCG表面呈现出许多团状结构,说明anti-HCG已修饰到电极的表面。采用X射线荧光光谱对电极表面进行表征,结果表明:未经修饰的Au电极在9.7 keV(⁷⁹Au L_{α1})和11.4 keV(⁷⁹Au L_{β1})处出现了⁷⁹Au的特征峰,未见¹⁶S的特征峰;对于修饰了1层{HL/AuNPs}的电极,上述Au的特征峰明显增强,且在2.3 keV(¹⁶S K_{α1})和2.5 keV(¹⁶S K_{β1})处出现了¹⁶S的特征峰,而随着{HL/AuNPs}_n的层数增加到2层、3层,电极表面相应的⁷⁹Au特征峰和¹⁶S特征峰依次增强,表明电极形成的HL、AuNPs修饰层的密度逐层提高。

1.3 测定过程

首先测定Au|{HL/AuNPs}_n-anti-HCG电极在pH 6.5、0.1 mol/L的PBS中的示差脉冲伏安曲

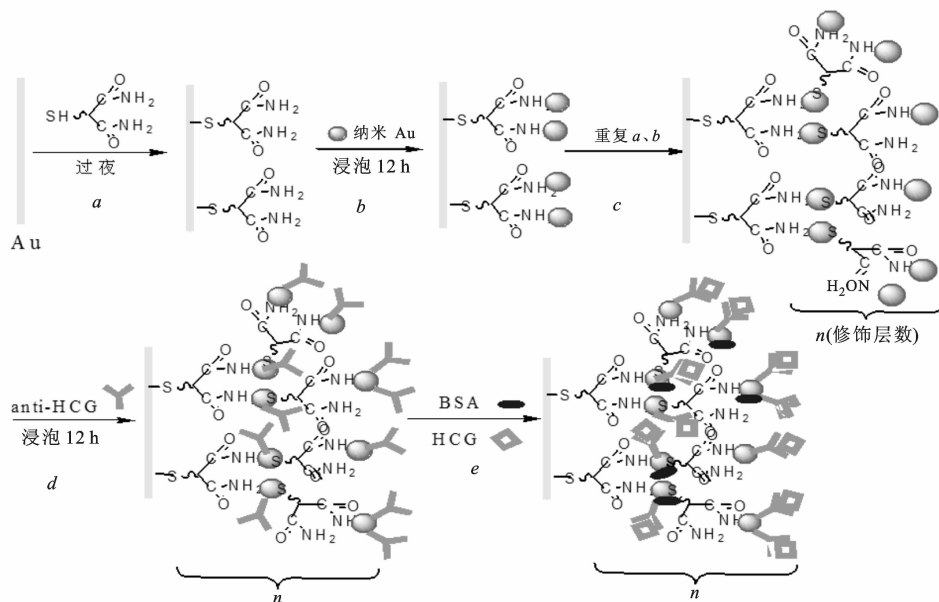


图1 $\text{Au}|\{\text{HL}/\text{AuNPs}\}_n\text{-anti-HCG}$ 免疫传感器的制备

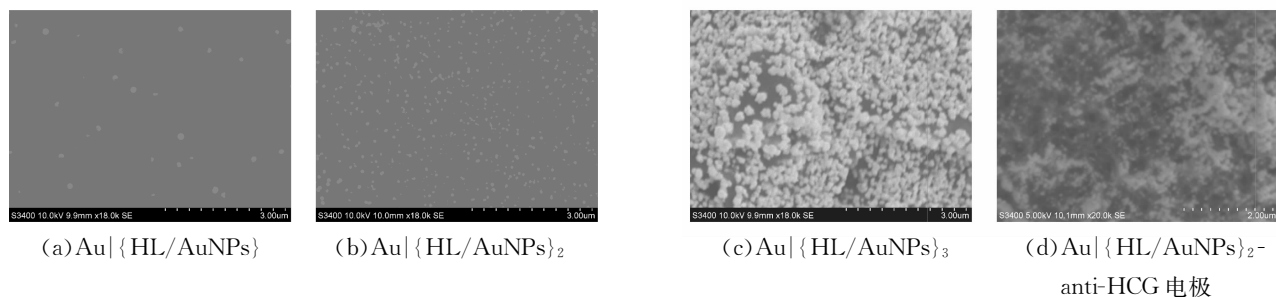


图2 修饰不同物质电极的扫描电镜图

线(DPV)峰电流 I_H (参数为:起始电位 0.6 V,终止电位 -0.2 V,电位减少 0.002 V,振幅 0.025 V,频率 15 Hz,等待时间 2 s),然后将 5 μL 不同浓度的 HCG 滴加到该电极的表面,在 35 $^{\circ}\text{C}$ 下温育 25 min 后,再在相同的 PBS 中扫描,并记录其电流值 I . $R_c = (I_H - I)/(I_H - I_0)$ (I_0 为反应达到饱和时的电流)表达了免疫传感器温育前、后电流降低的比率,其与溶液中待测 HCG 的浓度在一定范围内成正比。

每测定完 20 个试样后,将电极在含有 0.1 mol/L 的盐酸胍-PBS 底液中浸泡 12 h,使抗原从抗体上脱附,电极电流又可恢复到使用前的状态。

根据化学发光酶联免疫法^[8],采用 Abbott i2000 型化学发光仪和雅培公司的 HCG 试剂盒,按照标准操作流程对血清中的 HCG 进行检测。

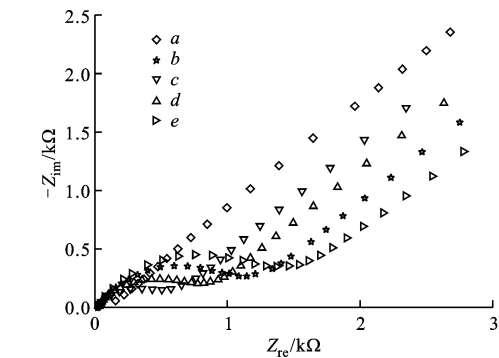
2 结果与讨论

2.1 不同修饰层电极的电化学表征

图 3 中的 $a \sim d$ 曲线分别为裸 Au、 $\text{Au}|\{\text{HL}/$

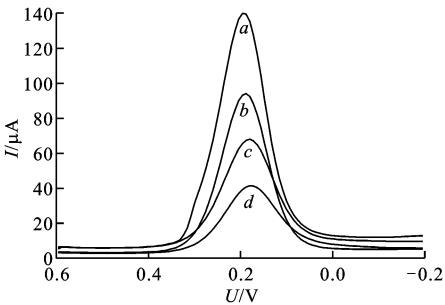
$\text{AuNPs}\}$ 、 $\text{Au}|\{\text{HL}/\text{AuNPs}\}_2$ 和 $\text{Au}|\{\text{HL}/\text{AuNPs}\}_2\text{-anti-HCG}$ 电极在 5 mmol/L $\text{K}_3(\text{FeCN})_6\text{-K}_4(\text{FeCN})_6$ 溶液(简称 FeCN,内含 0.5 mol/L KCl)中的交流阻抗图谱(称为 Nyquist 曲线),高频区弧形所在半圆的直径表示电子传递阻抗 (R_{et})。曲线 a 的 R_{et} 为 30 Ω ,曲线 b 的 R_{et} 增加到 1 100 Ω ,这是因为 HL 单分子层不导电,阻碍了 FeCN 中的电子在溶液与电极表面的传递。曲线 c 的 R_{et} 减小为 650 Ω ,表明尽管 HL 具有电绝缘性,但是随着电极表面导电的 AuNPs 的增加,有效地提高了 FeCN 中电子的传递速率。裸 Au、 $\text{Au}|\{\text{HL}/\text{AuNPs}\}$ 、 $\text{Au}|\{\text{HL}/\text{AuNPs}\}_2$ 电极的有效面积经测定分别为 3.20、5.27 和 7.31 mm^2 。曲线 d 的 R_{et} 增大到 950 Ω ,表明 anti-HCG 绝缘分子已经吸附到 AuNPs 上,阻碍了修饰电极表面的电子传递。将 $\text{Au}|\{\text{HL}/\text{AuNPs}\}_2\text{-anti-HCG}$ 免疫传感器在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、50 mg/L 的 HCG 溶液中温育 30 min,其 R_{et} (曲线 e)较温育之前(曲线 d)增加,这说明 HCG 和 anti-HCG 免疫

反应的结合物进一步阻碍了 FeCN 在电极表面的电子传递. 用示差脉冲伏安法表征了不同修饰电极在 FeCN 中的电化学性质,结果如图 4 所示. 由图 4 可见:金电极在 FeCN 溶液中表现出很好的电活性(见曲线 *a*);当电极表面修饰 2 层 {HL/AuNPs} 之后,FeCN 的还原电流明显增大(见曲线 *b*),其在电极表面的电子传递速度明显加快;将此电极浸泡在 anti-HCG 中 12 h,得 Au|{HL/AuNPs}₂-anti-HCG 传感电极,其峰电流(见曲线 *c*)较曲线 *b* 的峰电流显著下降,说明 anti-HCG 已吸附到电极表面的 AuNPs 上;将此传感电极浸泡在 50 mg/L HCG 中于 37 ℃ 温育 30 min 后,电极的峰电流进一步下降(见曲线 *d*),同样说明 HCG 和 anti-HCG 生成了不导电的免疫复合物,阻碍了 FeCN 在电极表面的传递速度.



a: Au; *b*: Au|{HL/AuNPs}₂; *c*: Au|{HL/AuNPs}₂; *d*: Au|{HL/AuNPs}₂-anti-HCG; *e*: Au|{HL/AuNPs}₂-anti-HCG 在 50 mg/L HCG 中温育,底液为 5.0 mmol/L FeCN(内含 0.1 mol/L KCl); 频率为 $1.0\times 10^{-2}\sim 1.0\times 10^5$ Hz

图 3 不同电极的交流阻抗图谱



a: Au; *b*: Au|{HL/AuNPs}₂; *c*: Au|{HL/AuNPs}₂-anti-HCG; *d*: Au|{HL/AuNPs}₂-anti-HCG 在 50 mg/L HCG 中温育,底液同图 3; 扫描速度为 100 mV/s

图 4 不同电极的示差脉冲伏安曲线

2.2 免疫反应条件的优化

通过研究 25~42 ℃ 之间免疫电极的示差脉冲伏安曲线峰电流,表明在 37 ℃ 时 *R_c* 达到最大值,因

此实验温育温度选择 37 ℃. 研究显示,随温育时间延长 *R_c* 不断上升,30 min 后出现一平台,说明此时抗原/抗体反应已达平衡,故选择最短的温育时间 30 min. 此方法与 ELISA 夹心法相比减少了二抗的加入,从而缩短了免疫反应所需的温育时间^[9].

2.3 修饰层数的影响

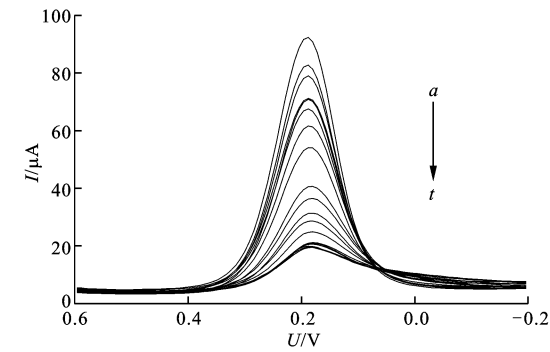
研究表明:当修饰层数 *n*=2 时,峰电流最大;修饰层数再增加时,峰电流反而降低. *n*=1, 2, 3 时,检测的线性范围分别为 5~40、0.1~100 和 3~15 mg/L,可见 *n*=2 时传感器的线性范围最宽. 分析原因可能是:随着修饰层数的增加,纳米金虽然增加但却彼此重叠覆盖,使得纳米结构消失. 实验中也发现,修饰 3 层薄膜的电极在扫描几圈后电流就急剧下降,扫描电镜观察发现有部分纳米金脱落. 因此,本实验选择修饰 2 层薄膜的传感电极用于检测.

2.4 HCG 的测定

采用构建的 Au|{HL/AuNPs}₂-anti-HCG 免疫传感器和灵敏度更高的示差脉冲伏安法,以 K₃Fe(CN)₆ 作为电子探针,对溶液中不同浓度的 HCG 进行了检测. 在最佳条件下,随着温育液中 HCG 浓度的不断增加,免疫传感器的安培响应逐渐降低(见图 5),降低比率 *R_c* 与 HCG 浓度在 0.1~100 mg/L 内成线性关系(见图 6),检测下限为 0.056 mg/L(3σ). 将本免疫传感器和文献报道的部分基于溶胶-凝胶法构筑的纳米金修饰 HCG 传感器进行了比较,测定方法均为间接法,即通过电流下降的比率进行定量比较,结果见表 1,可见本法构筑的 HCG 免疫传感电极较其他 AuNPs 修饰的 HCG 免疫传感器检测范围更宽,检测下限更低,检测时间也较短,对于唾液中痕量 HCG 的检测更具优势. 推测原因是:由于在电极表面可控修饰了多层 AuNPs,因此在其表面的三维立体空间中可吸附更多的 anti-HCG,使得检测 HCG 的浓度范围和灵敏度显著提高.

表 1 Au|{HL/AuNPs}₂-anti-HCG 免疫传感器和部分溶胶-凝胶法构建的 HCG 传感器比较

修饰方法	线性范围 /mg · L ⁻¹	检测限 /mg · L ⁻¹	检测时间 /min	参考文献
本文方法	0.1~100	0.056	30	
二氧化钛凝胶	2.5~12.5	1.4	50	[3]
壳聚糖凝胶	0.2~100	0.1	40	[10]
二氧化硅凝胶	5~30	1.4	50	[4]



曲线 a~t 对应的 HCG 浓度依次为 0、0.1、0.5、1.0、5、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140 和 150 mg/L

图5 不同浓度 HCG 的示差脉冲伏安曲线

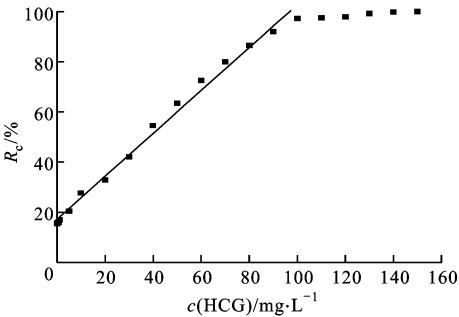


图6 HCG 的检测标准曲线

2.5 干扰、稳定性、重现性和电极表面再生

以 50 μg/L HCG 作为比对标准,依次加入 0.5~20 mg/L 过氧化物酶、0.2~100 g/L 尿酸、0.5~50 g/L α-淀粉酶和 0.4~50 g/L 免疫球蛋白(唾液中的主要共存组分,且均为正常人体浓度),研究表明 HCG 在传感器表面的响应电流变化很小(<10%),证明该传感器具有良好的抗干扰性.将构建的免疫传感器取出保存于 4℃、0.1 mol/L 的 PBS 溶液(pH=7.0)中 1 个月后,响应电流是最初电流的 90%,保存 3 个月后为 85%,说明该免疫传感器具有较好的稳定性.利用同一根电极分别对含 100 mg/L 和 25 mg/L 的 HCG 抗原样品进行测定,测定结果的平均值分别为 99 mg/L 和 23.2 mg/L,其 D_{rs} (相对标准偏差, $N=3$) 分别为 2.2% 和 2.4%,说明该传感电极对同一浓度样品的检测结果具有良好的重现性.采用同一电极测定 20 mg/L 的 HCG 样品 20 次后, $R_c<7\%$,随后将电极在 0.1 mol/L 的盐酸胍-PBS 底液中浸泡 12 h,使抗原从抗体上脱附,其电流大小又可恢复到使用前的状态,因此,可以通过在盐酸胍-PBS 底液中浸泡的方法使电极表面再生.

3 实际样品检测

采用本文方法对 10 份实际唾液样品进行了检测,并和标准的电化学免疫发光法(ECL)^[8]的检测结果进行了对照,结果见表 2.用统计相关方法对 2 种结果进行了比较,拟合公式为

$$c(\text{HCG}) = 0.9809c_{\text{ECL}}(\text{HCG}) + 0.2149$$
$$R^2 = 0.9909$$

表明本法测得的 HCG 和标准结果吻合得较好,方法可靠,能够用于唾液中 HCG 的检测.

表2 唾液样品中 HCG 的检测结果(N=3)

样品	$c(\text{HCG})/\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$				回收率/%
	本法 检测值	ECL 法 检测值	加入量	本法加标 后测定值	
1	0.31	0.25±0.01	0.3	0.60	96.7
2	1.81	1.72±0.07	2.0	3.83	101.0
3	2.72	2.74±0.08	3.0	5.45	91.0
4	1.78	1.82±0.04	2.0	3.91	106.5
5	3.22	3.10±0.09	3.0	6.02	93.3
6	4.89	4.90±0.15	5.0	10.1	104.2
7	3.25	3.20±0.10	3.0	6.44	106.3
8	4.05	3.95±0.40	4.0	8.12	101.8
9	3.82	3.80±0.12	4.0	7.72	97.5
10	3.50	3.40±0.23	3.5	6.68	90.9

4 结 论

本研究制备了一种快速测定人唾液中 HCG 含量的免疫传感器.与传统的免疫传感器相比,该传感器具有以下优势:

- (1)通过层层自组装获得多层有序的{HL/AuNPs}导电膜,由此大大提高了电极表面的活性,并具有优异的稳定性;
- (2)电极表面的多层 AuNPs 明显增加了 anti-HCG 的固载量及对 HCG 的检测范围,降低了检测下限;
- (3)检测时间短,电极能够再生.

该免疫传感器技术有望构筑一种高灵敏度的人唾液中 HCG 的筛测方法,具有潜在的临床应用价值.

参考文献:

[1] CHAI Rong, YUAN Ruo, CHAI Yaqin, et al. Am-

- perometric immunosensors based on layer-by-layer assembly of gold nanoparticles and methylene blue on thiourea modified glassy carbon electrode for determination of human chorionic gonadotrophin [J]. *Talanta*, 2008,74(5):1330-1336.
- [2] CHIAPPIN S, ANTONELLI G, GATTI R, et al. Saliva specimen: a new laboratory tool for diagnostic and basic investigation [J]. *Clinica Chimica Acta*, 2007, 383(1/2):30-40.
- [3] CHEN Jin, YAN Feng, DAI Zong, et al. Reagentless amperometric immunosensor for human chorionic gonadotrophin based on direct electrochemistry of horseradish peroxidase [J]. *Biosens, Bioelectron*, 2005,21(2):330-336.
- [4] 干宁,李榕生,陈亚东,等. 基于抗体包被金磁纳米微粒修饰电极的 HIVp24 和 gp36 安培联检芯片[J]. *西安交通大学学报*, 2009,43(7):115-119.
GAN Ning, LI Rongsheng, CHEN Yadong, et al. Micro fluidic amperometric immunosensor chip for HIV-p24 and gp36 antigens based on gold magnetic nanoensemble electrode [J]. *Journal of Xi'an Jiaotong University*, 2009,43(7):115-119.
- [5] CHEN Jin, TANG Jinhai, YAN Feng, et al. A gold nanoparticles/sol-gel composite architecture for encapsulation of immunoconjugate for reagentless electrochemical immunoassay [J]. *Biomaterials*, 2006, 27(10):2313-2321.
- [6] CHEN Jin, YAN Feng, TANG Jinhai, et al. Gold nanoparticles doped three-dimensional sol-gel matrix for amperometric human chorionic gonadotrophin immunosensor [J]. *Electroanalysis*, 2006,18(17):1696-1702.
- [7] GUO Wei, HU Naifei. Interaction of myoglobin with poly(methacrylic acid) at different pH in their layer-by-layer assembly films: an electrochemical study [J]. *Biophysical Chemistry*, 2007,129(2/3):163-171.
- [8] IDEGAMI K, CHIKAE M, KERMAN K, et al. Gold nanoparticle-based redox signal enhancement for sensitive detection of human chorionic gonadotropin hormone [J]. *Electroanalysis*, 2008,20(1):14-21.
- [9] WARAKORN L, PROESPICHAYA K, BO M, et al. A reusable capacitive immunosensor for human chorionic gonadotrophin detection using thiourea modified gold electrode [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2006,561(1/2):55-61.
- [10] YANG Gongmei, CHANG Yanbin, YANG Hui, et al. The preparation of reagentless electrochemical immunosensor based on a nano-gold and chitosan hybrid film for human chorionic gonadotrophin [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2009,644(1/2):72-77.

(编辑 葛赵青)

(上接第 49 页)

- [4] DUPEL P, BOURRAT X, PAILLER R. Structure of pyrocarbon infiltrated by pulse CVI [J]. *Carbon*, 1995,33(9):1193-1204.
- [5] LI Miaoling, QI Lehua, LI Hejun, et al. Measurement of the extinction angle about laminar pyrocarbons by image analysis in reflection polarized light [J]. *Materials Science and Engineering: A*, 2007, 448(1/2): 80-87.
- [6] 陈强,李贺军,李克智,等. 基体改性对碳/碳复合材料烧蚀率影响的神经网络模拟[J]. *西安交通大学学报*, 2003,37(3):249-251.
CHEN Qiang, LI Hejun, LI Kezhi, et al. Neural network simulation on effect of burning rate of modified carbon/carbon composites [J]. *Journal of Xi'an Jiaotong University*, 2003,37(3):249-251.
- [7] OBERLIN A. Pyrocarbons [J]. *Carbon*, 2002,40(1): 7-24.
- [8] HARILICK R M, SHANMUGAM K. Textural features for image classification [J]. *IEEE Trans on Systems, Man, and Cybernetics*, 1973,3(6):610-621.
- [9] SUN C J, WEE W G. Neighboring gray level dependence matrix for texture classification [J]. *Computer Vision, Graphic Image Process*, 1983,23:341-352.
- [10] LI Aijun, LI Hejun, LI Kezhi, et al. Modeling of CVI process in fabrication of carbon/carbon composites by an artificial neural network [J]. *Science in China: E*, 2003,46(2):173-181.
- [11] GUO Lijie, GAO Jinjin, YANG Jianfeng, et al. Criticality evaluation of petrochemical equipment based on fuzzy comprehensive evaluation and a BP neural network [J]. *Journal of Loss Prevention in the Process Industries*, 2009,22(4):469-476.

(编辑 葛赵青)