



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111505140 A

(43)申请公布日 2020.08.07

(21)申请号 202010336306.X

G01N 33/68(2006.01)

(22)申请日 2020.04.24

B82Y 40/00(2011.01)

B82Y 5/00(2011.01)

(71)申请人 厦门大学

地址 361005 福建省厦门市思明区思明南路422号

(72)发明人 王秋泉 刘珍 袁榕 梁勇 葛赋春

(74)专利代理机构 厦门南强之路专利事务所 (普通合伙) 35200

代理人 张素斌

(51)Int.Cl.

G01N 30/02(2006.01)

G01N 30/06(2006.01)

G01N 30/86(2006.01)

G01N 30/72(2006.01)

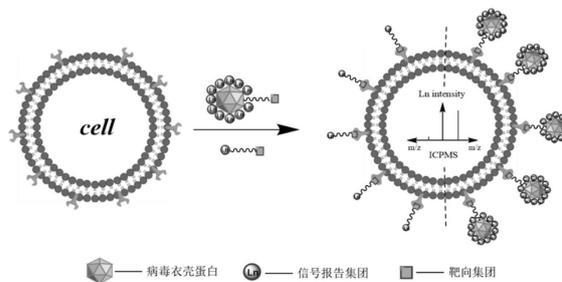
权利要求书1页 说明书6页 附图4页

(54)发明名称

基于病毒衣壳蛋白纳米结构的化学信号放大倍增器及制备方法和应用

(57)摘要

基于病毒衣壳蛋白纳米结构的化学信号放大倍增器及制备方法和应用。所述基于病毒衣壳蛋白纳米结构的化学信号放大倍增器是由组装有靶向基团和信号报告基团的病毒衣壳蛋白组成。通过靶向基团对目标分子的特异性识别,利用组装在病毒衣壳蛋白表面的多个报告分子即可实现显著的信号放大和倍增。本发明的基于病毒衣壳蛋白纳米结构的化学信号放大倍增器制备简单快捷,靶向基团和信号报告基团数目明确,可实现目标生物分子的高灵敏和高选择性定量分析,为极低含量的关键生物标志物和病变细胞以及致病细菌和病毒的分析检测提供新的解决方案,在生物医学分析领域具有广泛的应用价值。



1. 基于病毒衣壳蛋白纳米结构的化学信号放大倍增器, 其特征在于: 包括病毒衣壳蛋白、靶向基团和信号报告基团; 所述靶向基团和信号报告基团通过化学共价链接分别组装在病毒衣壳蛋白表面。

2. 权利要求1所述的基于病毒衣壳蛋白纳米结构的化学信号放大倍增器的制备方法, 其特征在于包括以下步骤:

1) 制备并纯化病毒衣壳蛋白;

2) 将纯化的病毒衣壳蛋白表面的氨基转化为巯基, 得到巯基修饰的病毒衣壳蛋白;

3) 通过病毒衣壳蛋白表面的巯基与马来酰亚胺进行亲核加成反应, 分别将靶向基团和信号报告基团组装到病毒衣壳蛋白上。

3. 如权利要求2所述的制备方法, 其特征在于步骤2) 的方法如下:

将纯化好的病毒衣壳蛋白置于超滤管中, 离心脱盐, 溶于含有乙二胺四乙酸的 NaHCO_3 缓冲液中, 振荡混匀; 加入过量2-亚氨基硫烷盐酸盐试剂, 室温振荡过夜反应; 取反应液于超滤管中离心, 加入超纯水重悬离心, 取出并溶于含有三(2-羧乙基)磷的4-羟乙基哌嗪乙磺酸缓冲液中, 即得巯基修饰的病毒衣壳蛋白。

4. 如权利要求3所述的制备方法, 其特征在于: 所述 NaHCO_3 缓冲液的pH 7.5~8.5, 浓度50~200mM; 所述含有三(2-羧乙基)磷的4-羟乙基哌嗪乙磺酸缓冲液pH 6.4~6.8, 浓度50~200mM; 所述2-亚氨基硫烷盐酸盐试剂浓度为病毒衣壳蛋白的100~500倍。

5. 如权利要求2所述的制备方法, 其特征在于步骤3) 的方法如下: 首先将马来酰亚胺-靶向基团和马来酰亚胺-信号报告基团母液振荡混匀混合, 然后将混合后的溶液加入到巯基修饰的病毒衣壳蛋白溶液中进行亲核加成反应, 最后将反应液置于超滤管中离心, 超纯水重悬离心, 溶于pH 7.4浓度为50~200mM的4-羟乙基哌嗪乙磺酸缓冲液中。

6. 如权利要求5所述的制备方法, 其特征在于: 亲核加成反应时间为4~8h; 所述混合后的溶液浓度与巯基修饰的病毒衣壳蛋白溶液的浓度为(60~120):1。

7. 如权利要求2所述的制备方法, 其特征在于: 所述病毒衣壳蛋白包括噬菌体类的病毒、植物类的病毒或B型肝炎病毒的病毒衣壳蛋白。

8. 如权利要求2所述的制备方法, 其特征在于: 所述信号报告基团为与任何检测器相匹配的有信号响应的分子。

9. 如权利要求2所述的制备方法, 其特征在于: 所述靶向基团为对生物体系中目标分子具特异性识别的分子。

10. 基于病毒衣壳蛋白纳米结构的化学信号放大倍增器在生物分析中的应用, 其特征在于: 针对目标生物分子和细胞、细菌、病毒分析的可控信号放大和倍增。

基于病毒衣壳蛋白纳米结构的化学信号放大倍增器及制备方法和应用

技术领域

[0001] 本发明涉及生化试剂设计制备和生物分析化学领域,尤其涉及基于病毒衣壳蛋白纳米结构的化学信号放大倍增器及制备方法和应用。

背景技术

[0002] 基于病毒衣壳蛋白纳米结构的软信号放大倍增器是一种可进行化学调控的“软”化学信号放大倍增器。不同于传统的物理光电信号放大机理,该软信号放大倍增器可实现对复杂生物体系中极低含量目标分子的特异性高灵敏检测和精确含量测定。

[0003] 质谱是生物医学分析的重要工具之一。其中,电感耦合等离子体质谱(ICPMS),因近年来化学选择性和生物特异性元素标记技术和方法的快速发展,可以通过对所标记的元素的同位素稀释检测实现多个目标生物分子、病变细胞、致病细菌和病毒的高选择、高灵敏度同时定量分析,克服了光学标记方法的光谱重叠和荧光背景干扰等不足。ICPMS所具有的多元素同时检测,宽至九个数量级的动态范围,特别是,同位素稀释绝对定量的特点,在定量生物医学分析领域展现了独特的优势。精准生物信息的获得对于更深入和更加全面地理解相关生物学过程和机制、疾病诊断以及相关治疗药物的发现和设计等都有重要意义。

[0004] 然而,针对极低含量的生物标志物分子、病变细胞、致病细菌和病毒的定量分析检测,特别是单细胞分析,现有质谱技术的灵敏度稍显不足。现有基于无机纳米颗粒和带有金属螯合配体的聚合物的信号放大方法存在所含原子数目难以精确定量或是合成繁冗或是生物相容性有待提高等问题,且成本极高。

发明内容

[0005] 本发明的目的在于解决现有技术中的上述问题,从颗粒尺寸、生物毒性、精确组装数目及合成方法等关键问题出发,提供基于病毒衣壳蛋白纳米结构的化学信号放大倍增器及制备方法和应用,这种天然生物纳米颗粒尺寸均一且形态规整,表面的官能团具有确定的数目,可实现精准调控,同时这种生物纳米颗粒具有良好的生物相容性,制备方法简单快捷。

[0006] 为达到上述目的,本发明采用如下技术方案:

[0007] 基于病毒衣壳蛋白纳米结构的化学信号放大倍增器,包括病毒衣壳蛋白、靶向基团和信号报告基团;所述靶向基团和信号报告基团通过化学共价链接分别组装在病毒衣壳蛋白表面。

[0008] 基于病毒衣壳蛋白纳米结构的化学信号放大倍增器的制备方法,包括以下步骤:

[0009] 1) 制备并纯化病毒衣壳蛋白;

[0010] 2) 将纯化的病毒衣壳蛋白表面的氨基转化为巯基,得到巯基修饰的病毒衣壳蛋白;

[0011] 3) 通过病毒衣壳蛋白表面的巯基与马来酰亚胺进行亲核加成反应,分别将靶向基

团和信号报告基团组装到病毒衣壳蛋白上。

[0012] 本发明步骤2)的方法如下:

[0013] 将纯化好的病毒衣壳蛋白置于超滤管中,离心脱盐,溶于含有乙二胺四乙酸(EDTA)的 NaHCO_3 缓冲液中,振荡混匀;加入过量2-亚氨基硫烷盐酸盐(Traut's)试剂,室温振荡过夜反应;取反应液于超滤管中离心,加入超纯水重悬离心,取出并溶于含有三(2-羧乙基)膦(TCEP)的4-羟乙基哌嗪乙磺酸(HEPES)缓冲液中,即得巯基修饰的病毒衣壳蛋白;

[0014] 所述 NaHCO_3 缓冲液的pH 7.5~8.5,浓度50~200mM;所述含有三(2-羧乙基)膦的4-羟乙基哌嗪乙磺酸缓冲液pH 6.4~6.8,浓度50~200mM;所述2-亚氨基硫烷盐酸盐试剂浓度为病毒衣壳蛋白的100~500倍。

[0015] 本发明,步骤3)的方法如下:首先将马来酰亚胺-靶向基团和马来酰亚胺-信号报告基团母液振荡混匀混合,然后将混合后的溶液加入到巯基修饰的病毒衣壳蛋白溶液中进行亲核加成反应,最后将反应液置于超滤管中离心,超纯水重悬离心,溶于pH 7.4浓度为50~200mM的HEPES缓冲液中;

[0016] 亲核加成反应时间为4~8h;所述混合后的溶液浓度与巯基修饰的病毒衣壳蛋白溶液的浓度为(60~120):1;它们的含量及比例可根据预期组装的靶向基团和信号报告基团的数目进行调整。

[0017] 所述病毒衣壳蛋白可以是但不限于噬菌体类的病毒,如MS2、QB和M13等,也可以是植物类的病毒,如豇豆褪绿斑驳病毒(CCMV)、豇豆花叶病毒(CPMV)和棒状的烟草花叶病毒(TMV)等,或者是B型肝炎病毒(HBV)的病毒衣壳蛋白。

[0018] 所述信号报告基团为与任何检测器相匹配的有信号响应的分子,比如质谱。

[0019] 所述靶向基团为对生物体系中目标分子具特异性识别的分子。

[0020] 基于病毒衣壳蛋白纳米结构的化学信号放大倍增器在生物分析中的应用,针对目标生物分子和细胞、细菌、病毒分析的可控信号放大和倍增。

[0021] 相对于现有技术,本发明技术方案取得的有益效果是:

[0022] 1、所述病毒衣壳蛋白具有独特的纳米笼状结构,尺寸均一,形态规整,在生物缓冲液中单分散性好,生物相容性好,且具有确定数目的可进行组装的官能团,可实现对不同官能团的可控精准组装。该信号放大倍增器制备过程简单,可广泛用于不同目标生物分子和细胞、细菌、病毒的定量分析。

[0023] 2、通过对病毒衣壳蛋白表面具有化学反应活性的氨基进行巯基修饰,与马来酰亚胺进行高效的亲核加成反应,分别组装信号报告基团和靶向基团;通过进一步选择和调控信号报告基团和靶向基团的种类和比例,可实现对不同目标分析物的可控信号放大和倍增,实现对复杂生物体系中极低含量目标分子的检测和单细胞、细菌、病毒分析。

[0024] 3、在病毒衣壳蛋白表面组装的靶向基团可实现复杂生物体系目标分子、细胞、细菌和病毒的特异性选择,无需经过复杂的分离提纯便可实现对目标分析物的特异性检测;组装在病毒衣壳蛋白纳米结构上的可调控且数目确切的信号报告分子在提高检测灵敏度的同时,也可实现数量级含量差别的目标分析物的同时精准定量分析,在生物医学分析应用领域具有独特超凡的优势。

附图说明

[0025] 图1为基于病毒衣壳蛋白纳米结构的化学信号放大倍增器放大机理示意图。

[0026] 图2为基于病毒衣壳蛋白纳米结构的化学信号放大倍增器的制备途径。

[0027] 图3为MS2噬菌体衣壳蛋白氨基巯基修饰前(a)后(b)的TEM表征。

[0028] 图4为基于Traut's试剂的MS2表面氨基巯基修饰前后的ESI-qTOF-MS高分辨质谱表征。

[0029] 图5为MS2噬菌体衣壳蛋白组装靶向基团和元素信号报告基团后的尺寸排阻色谱(SEC)柱后同位素稀释(SUID) SEC-ICPMS ^{151}Eu 和 ^{153}Eu 色谱图和Eu质量流图。

[0030] 图6为MS2噬菌体衣壳蛋白组装靶向基团和元素信号报告基团的具体数目。

[0031] 图7为HepG2细胞在马来酰亚胺-靶向基团(MAL-PEG-ALK)和马来酰亚胺-元素信号报告基团(MAL-DOTA-Eu)不同比例下组装得到的MS2噬菌体衣壳蛋白的ICPMS ^{153}Eu ($^{153}\text{Eu}_{\text{spike}} \times 99.9\% + ^{153}\text{Eu}_{\text{sample}} \times 52.19\%$)检测图。

[0032] 图8为ALK-PEG-MS2-DOTA-Eu的 ^{153}Eu 信号 ($^{153}\text{Eu}_{\text{spike}} \times 99.9\% + ^{153}\text{Eu}_{\text{sample}} \times 52.19\%$)放大前后HepG2细胞的计数。

具体实施方式

[0033] 为了使本发明所要解决的技术问题、技术方案及有益效果更加清楚、明白,以下结合附图和实施例,对本发明做进一步详细说明。

[0034] 为了提高检测特异性和灵敏度,本发明主要包括:病毒衣壳蛋白、靶向基团、信号报告基团。如图1~2所示,本发明对天然的病毒衣壳蛋白纳米结构表面进行组装,使其分别组装上靶向基团和信号报告基团,靶向基团可以特异性识别细胞表面的目标分子,信号报告基团具有信号响应,从而实现复杂生物体系中目标生物分子和细胞分析的可控信号放大和倍增。

[0035] 实施例1:病毒衣壳蛋白的制备和纯化

[0036] 本实施例以MS2噬菌体衣壳蛋白为例,它是由180个化学结构一致的亚基组成,每个亚基含有129个氨基酸残基,形成正二十面体对称结构,尺寸为26nm。由于其他的病毒衣壳蛋白也具有类似规整的笼状结构及可组装的位点,因此本实施例也可以应用于其他病毒衣壳蛋白。下面将以MS2噬菌体病毒衣壳蛋白为例来说明本发明的技术方案。

[0037] (1) 宿主菌E.coli (ATCC 15597)涂板复苏后,挑取单克隆到装有液体培养基的烧瓶中,置于摇床(37°C, 200r/min)培养6~8h,期间半小时测一次OD₆₀₀值。加琼脂固体培养基灭菌后趁热倒板,静置凝固。取OD₆₀₀值为1.0的菌液,稀释至 $10^{-5} \sim 10^{-9}$,各取200μL于平板涂匀后倒置于37°C培养箱过夜。半固体培养基恒温46°C待用,取3mL半固体琼脂(0.75%)培养基于试管,加入上述宿主菌500μL,混匀后迅速倒入单层琼脂板,摇晃铺匀,静置待凝固。安瓿瓶中干粉状噬菌体用1mL培养基溶解,取0.5mL噬菌体粉末溶液加入到4.5mL培养基中稀释。取100μL稀释的噬菌体液滴到上述琼脂板,待干后,放培养箱过夜。刮取部分透明的噬菌体用培养基浸没30min,6500r/min离心15min后取上清作为噬菌体母液。

[0038] (2) 取噬菌体母液,加入到培养至OD₆₀₀值达1.0左右的宿主菌E.coli液体培养基中,置于摇床(37°C, 200r/min),继续培养24h。混合溶液离心6500r/min,15min,取上清液即为噬菌体液。

[0039] (3) 取噬菌体液加入PEG₆₀₀₀至浓度为10%，摇匀后静置过夜，离心12000r/min，30min，去上清。沉淀用少量PBS重悬，离心6500r/min，15min，取上清。再次重复2~3次，最后将噬菌体液用0.22μm滤膜过滤，用50KDa超滤管离心进行再次浓缩。收集浓缩液4℃保存。

[0040] (4) 为了实现对MS2噬菌体内部的氨基酸组装，采取去核酸的方法。噬菌体经pH 11.8的磷酸盐处理4h，经磷酸盐处理后的噬菌体通过高效液相尺寸排阻色谱纯化，收集8~10min的流出液即为去核酸后的MS2噬菌体，用50KDa超滤管浓缩后放4℃保存。

[0041] MS2噬菌体衣壳蛋白的表征：通过透射电镜图3 (a) 可以看出，用磷钨酸负染法制样后，去核酸后，因为核酸除去导致噬菌体内部空出，负染剂进入使内部为黑色，说明了MS2噬菌体内部核酸已经成功除去，同时可以看出MS2噬菌体衣壳蛋白的尺寸约为26nm；通过ESI-qTOF-MS图4 (a) 的表征，测得MS2噬菌体单个亚基的分子量为13741Da。

[0042] 实施例2：MS2噬菌体衣壳蛋白表面氨基的巯基修饰

[0043] 取制备好的MS2噬菌体衣壳蛋白于50KDa超滤管中，6500r/min，15min离心脱盐，用超纯水重悬，再次离心，重复2次，取出溶于100mM，pH 8.0的NaHCO₃缓冲液；再加入2~5mM EDTA溶液，振荡混匀；加入100倍当量的Traut's试剂于体系中，振荡混匀，室温振荡反应6h；反应结束后，将反应液置于50KDa超滤管中离心6500r/min，15min，加入超纯水重悬，再次离心，重复3次，除去反应后剩余过量的小分子，取出溶于含有1mM TCEP的pH 6.8浓度100mM的HEPES缓冲液中。

[0044] 通过透射电镜TEM实验结果表明图3 (b)，在巯基修饰之后MS2噬菌体衣壳蛋白同样具有良好的分散性，且尺寸在组装前后保持不变。

[0045] 通过优化Traut's试剂标记的浓度和反应时间、温度等多种反应条件，由图4 (b) 可看出实现了MS2每个亚基表面所有巯基的完全转化(六个氨基全部转化为巯基，单个MS2噬菌体衣壳蛋白表面共有 $180 \times 6 = 1080$ 个巯基)。

[0046] 实施例3：靶向基团和信号报告基团的组装

[0047] 本发明的靶向基团可以替换成任何可与目标生物分子特异性结合的基团，信号报告基团可以替换成任何有检测响应信号的分子。这里靶向基团以生物正交基团炔基(ALK)和信号报告基团以1,4,7,10-四氮杂环十二烷-1,4,7,10-四乙酸(DOTA)-镧系金属元素钕配合物(DOTA-Eu)为例，来说明ALK和DOTA-Eu在MS2噬菌体衣壳蛋白上的具体组装过程。

[0048] (1) 取1mg马来酰亚胺-靶向基团(MAL-PEG-ALK)和马来酰亚胺-元素信号报告基团(MAL-DOTA-Eu)配成1mM母液，将MAL-PEG-ALK和MAL-DOTA-Eu母液按照不同比例(1/2, 1/5, 1/10, 1/25, 1/50, 1/75, 1/100, 0/1)混合。

[0049] (2) 将混合后的溶液加入到巯基修饰的MS2噬菌体衣壳蛋白溶液中，所加入的量为100倍当量的MS2噬菌体衣壳蛋白，置于振荡仪上1000r/min，室温反应6h。

[0050] (3) 反应结束后将反应液置于超滤管中离心，超纯水重悬离心，重复3~5次，溶于pH 7.4浓度为100mM HEPES缓冲液中。

[0051] (4) SEC-SUID-ICPMS确定MS2噬菌体衣壳蛋白上组装的靶向基团和元素信号报告基团的具体数目。

[0052] 由图5 SEC-SUID-ICPMS色谱图中的¹⁵¹Eu和¹⁵³Eu信号可以看出在保留时间8~10min有色谱峰出现，表明MS2噬菌体衣壳蛋白表面已组装上了元素信号报告基团；再将¹⁵¹Eu和¹⁵³Eu色谱图转换成质量流图，可以进一步计算得出不同比例下组装的元素信号报告

基团的数目。图6可以看出不同比例下的MAL-PEG-ALK组装数目在31~579不等, MAL-DOTA-Eu组装数目在471~1019不等, 表明靶向基团和信号报告基团的组装数目可以依据它们的比例进行调控。

[0053] 实施例4:通过目标生物分子与靶向基团特异性识别对其进行检测。

[0054] 由于靶向基团为ALK, 其可与叠氮进行生物正交反应, 因此本实施例以检测肝癌细胞HepG2表面上代谢组装的叠氮岩藻糖蛋白为例来说明具体检测过程。

[0055] (1) 细胞复苏

[0056] 取冻存的HepG2细胞, 37℃水浴锅中迅速解冻1min, 放入离心机中1000r/min离心3min, 弃去上清液, 将细胞加入到10%胎牛血清(FBS)的RPMI 1640细胞培养液中, 置于37℃, 5%CO₂的培养箱中培养12h。

[0057] (2) 细胞换液

[0058] 待细胞贴壁后, 弃去原有培养液, 加PBS清洗2次, 更换新的10%FBS的RPMI 1640细胞培养液, 置于37℃, 5%CO₂的培养箱中培养。

[0059] (3) 细胞传代

[0060] 待细胞密度生长至80%左右, 弃去原有培养液, 加PBS清洗2次, 再加入胰蛋白酶消化2~3分钟, 显微镜下观察细胞状态, 当大部分细胞胞质回缩, 加入培养基终止消化, 轻轻吹打使细胞从培养皿上脱落, 分装到离心管中1200r/min离心3min, 弃上清, 加入1mL培养基重悬后置于新的含10%FBS的RPMI 1640细胞培养液中。

[0061] (4) 细胞代谢

[0062] 待传代好的细胞贴壁生长24h, 细胞密度大约在50~60%, 弃去培养皿内原有的培养液, 加入新的含10%FBS的RPMI 1640细胞培养液, 加入200μM叠氮岩藻糖, 摇晃混匀置于37℃, 5%CO₂的培养箱中培养2~3d, 使细胞表面的岩藻糖蛋白代谢上叠氮岩藻糖。

[0063] (5) 细胞表面岩藻糖ICPMS定量检测

[0064] 取上述代谢好的细胞, 吸除培养基, PBS缓冲液清洗4~5次, 用胰蛋白酶消化2~3min, 离心后重悬到100mM HEPES缓冲液(pH 7.4)中, 加入组装了ALK靶向基团和DOTA-Eu的MS2噬菌体衣壳蛋白(ALK-PEG-MS2-DOTA-Eu)进行click反应, 同时以直接组装有靶向基团的镧系元素(ALK-DOTA-Eu)作为对照。反应后离心1200r/min, 3min, 弃上清, 加100mM HEPES缓冲液(pH 7.4), 重悬离心, 重复3~5次, 除去过量未反应完的标签。将细胞重悬在HEPES缓冲液中用细胞计数板进行计数, 计数后通过ICPMS进行分析测定, 每个样品平行测定七次。

[0065] 通过¹⁵³Eu-SUID-ICPMS测得采用ALK-PEG-MS2-DOTA-Eu信号放大倍增后HepG2细胞表面¹⁵³Eu信号增大445~1005倍不等, 在靶向基团(MAL-PEG-ALK)与元素信号报告基团(MAL-DOTA-Eu)比例达到1:50时, 信号放大比例达到最大, 信号增大1005倍(图7)。

[0066] 在优化最佳比例的靶向基团(MAL-PEG-ALK)与元素信号报告基团(MAL-DOTA-Eu)后, 通过对不同数目的细胞进行click反应, 经¹⁵³Eu-SUID-ICPMS定量分析。实验结果如图8所示, ¹⁵³Eu信号与样品中细胞的数目呈线性关系。通过计算得出不采用信号放大方法, 直接与ALK-DOTA-Eu进行反应, 测得该方法岩藻糖检出限为3.38fmol, 而采用ALK-PEG-MS2-DOTA-Eu信号放大倍增后, 其检出限为3.36amol(图8)。较信号放大前, 检出限降低了3个数量级, 信号放大倍增了1005倍, 表明该方法在检测极低含量目标物方面具有显著优势, 可实现amol数量级的目标分子测定, 实现单个细胞表面岩藻糖的分析。

[0067] 本发明利用天然的病毒衣壳蛋白纳米结构尺寸均一、形态规整,具有数目确定且易于组装的化学基团的特点,对其进行精准的靶向基团和信号报告基团的化学组装是获得生物分析化学信号放大倍增器的有效途径。可通过调控靶向基团和信号报告基团的大小及比例来进一步调控其组装在病毒衣壳蛋白表面的数目及其所处的位置,以实现不同含量的目标分析物的同时定量分析,可以针对不同的目标分子,选择不同的靶向基团进行组装,进而实现不同目标分析物的选择性检测。

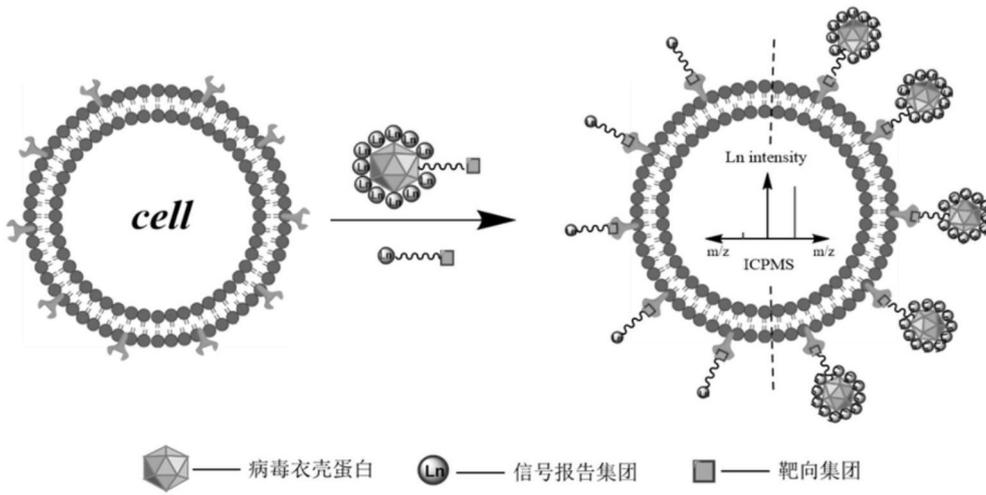


图1

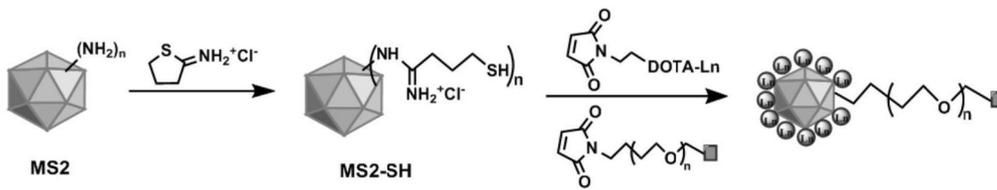


图2

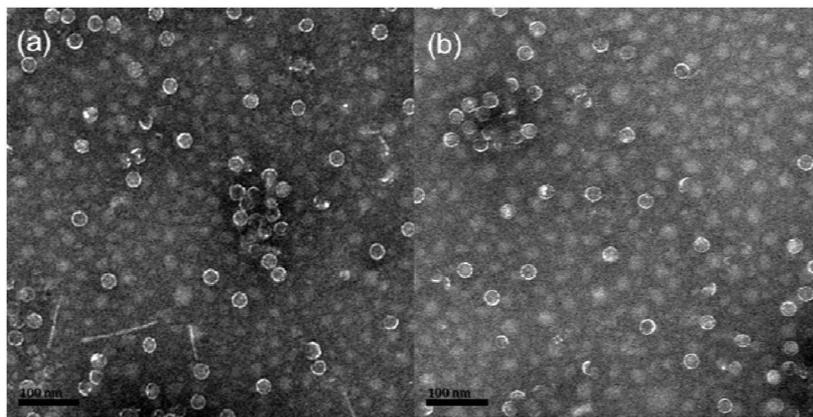


图3

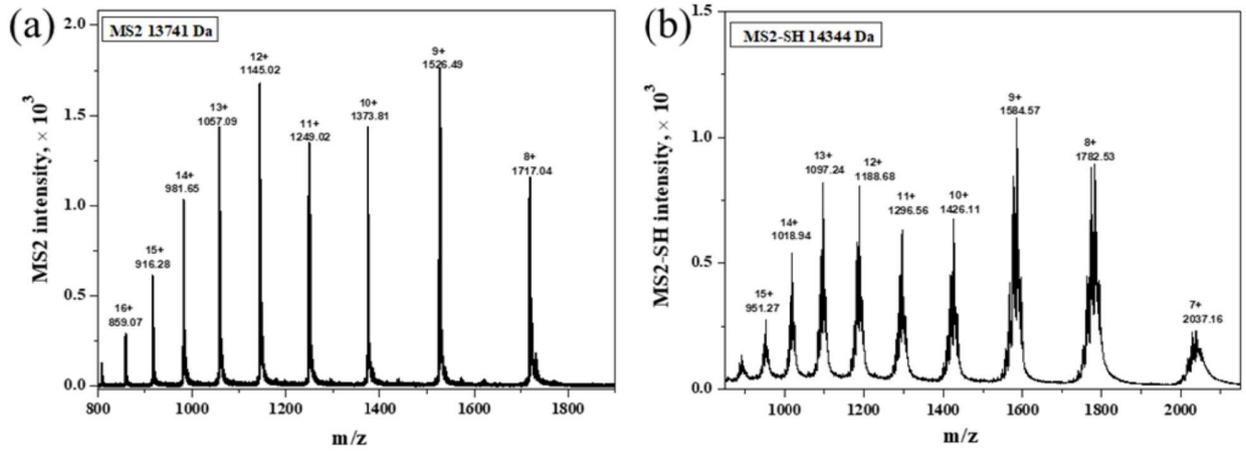


图4

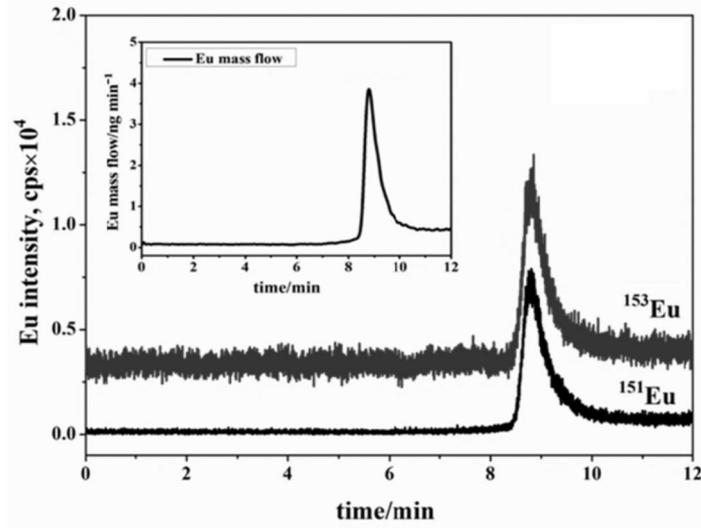


图5

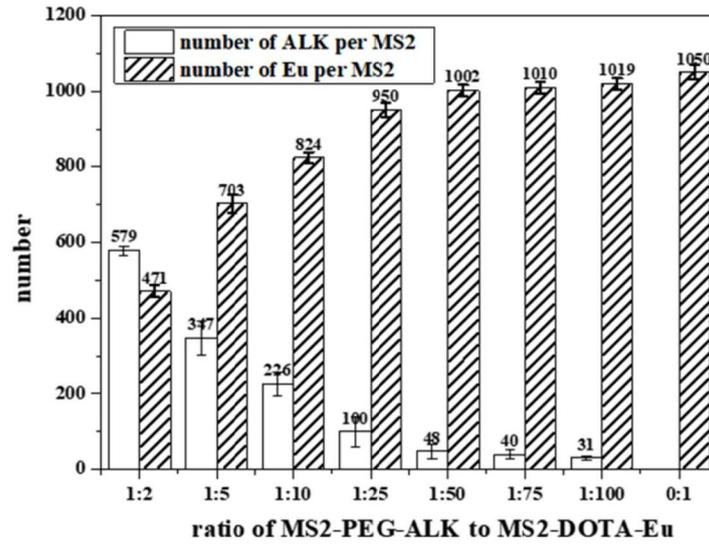


图6

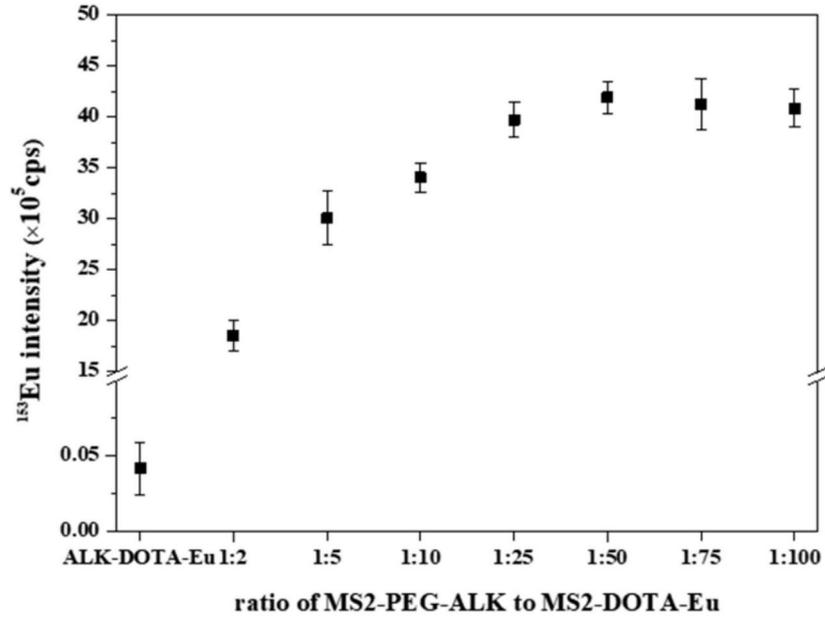


图7

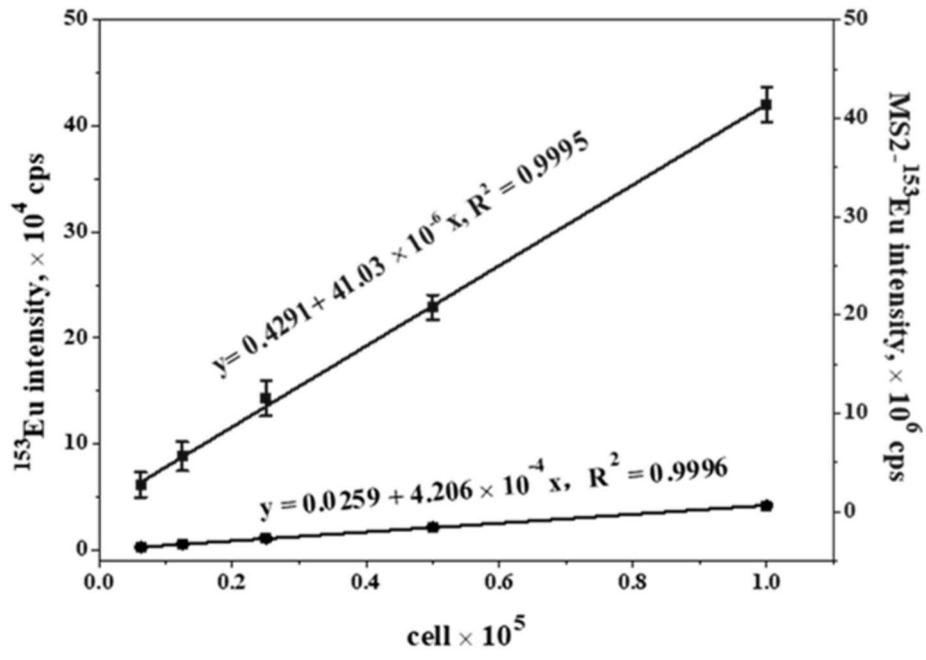


图8