



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101990638 B

(45) 授权公告日 2014.02.05

(21) 申请号 200980112571.1
 (22) 申请日 2009.04.10
 (30) 优先权数据
 10-2008-0033262 2008.04.10 KR
 10-2008-0111446 2008.11.11 KR
 (85) PCT国际申请进入国家阶段日
 2010.10.09
 (86) PCT国际申请的申请数据
 PCT/KR2009/001839 2009.04.10
 (87) PCT国际申请的公布数据
 W02009/125989 KO 2009.10.15
 (73) 专利权人 多利我泽株式会社
 地址 韩国首尔
 (72) 发明人 朴炯淳 苏相琬 吕运石 李寿载
 李政录 李宙姬 金光杓
 (74) 专利代理机构 北京银龙知识产权代理有限公司 11243
 代理人 钟晶
 (51) Int. Cl.
 G01N 33/53(2006.01)
 G01N 33/533(2006.01)
 G01N 5/00(2006.01)
 G01N 33/68(2006.01)
 (56) 对比文件
 US 2005074551

A1, 2005.04.07, [0055]-[0075], 图1.
 US 2005074551
 A1, 2005.04.07, [0055]-[0075], 图1.
 US 6197515 B1, 2001.03.06, 全文.
 CN 1480732 A, 2004.03.10, 全文.
 CN 1553188 A, 2004.12.08, 全文.
 KR 100737689 B1, 2007.07.03, 全文.
 KIM YOUNG-PIL. 等. Gold nanoparticle-enhanced secondary ion mass spectrometry imaging of peptides on self-assembled monolayers. 《ANALYTICAL CHEMISTRY》. 2006, 第78卷(第6期), 摘要和表1.
 MRKSICH MILAN. Mass spectrometry of self-assembled monolayers: a new tool for molecular surface science. 《ACS NANO》. 2008, 第2卷(第1期), 7-18.
 SHEN 等. Preparation and characterization of nitrilotriacetic-acid-terminated self-assembled monolayers on gold surfaces for matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight-mass spectrometry analysis of proteins and peptides. 《ANALYTICAL BIOCHEMISTRY》. 2005, 第345卷(第2期), 258-269.

(续)

审查员 许慧娜

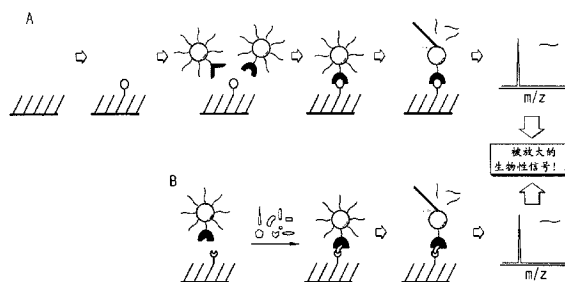
权利要求书2页 说明书12页 附图7页

(54) 发明名称
 新的质量分析信号的放大技术

(57) 摘要

本发明涉及新的方式的质量分析信号的放大技术。更具体而言,本发明中,提供发生信号的放大的新的方式的检测方法和用于该方法的分析系统、以及放大用金颗粒;所述方法如下:i)使表面改性后而能与靶分子选择性结合的金颗粒、与期望确认是否存在靶分子的试样接触后,ii)如果前述金颗粒和靶分子之间发生结合等相互作用,修饰前述金颗粒的低分子化合物则产生质量分析信号,iii)即使是微量存在的靶分子,前述低分

子化合物也能大规模产生质量信号,从而发生信号的放大。根据本发明,不进行试样的预处理也能将期望的物质的信号特异性放大,因此具有能够简便且精密地测定靶分子的优点。



[转续页]

CN 101990638 B

[接上页]

(51) Int. Cl.

G01N 33/48 (2006.01)

1. 一种靶分子的分析系统,其特征在于,所述分析系统含有:

用于捕获靶分子和放大质量分析信号的金颗粒,其为表面经有机分子改性的金颗粒;
以及

用于将所述金颗粒和待分析的试样固定于支撑体的表面上的靶固定面,其中,所述靶固定面具有固相的支撑体,所述支撑体的表面能够通过共价键或非共价键固定用于分析是否存在靶分子的试样,

其中,所述金颗粒具有:

多个信号产生部,其连接在所述金颗粒的表面,在所述表面形成自组装单分子层;

1个以上的连接部,其结合在所述金颗粒的表面;以及

捕获子,其连接在所述连接部,与靶分子特异性结合或者发生特异性反应,其中,所述信号产生部为在所述金颗粒的质量分析过程中从所述金纳米颗粒游离而生成多个质量有别于靶分子的大小的有机阳离子的有机分子。

2. 根据权利要求1所述的靶分子的分析系统,其特征在于,所述固相的支撑体选自由玻璃、硅、金属、半导体和塑料组成的组。

3. 根据权利要求1所述的靶分子的分析系统,其特征在于,所述靶固定面为生物芯片。

4. 根据权利要求1所述的靶分子的分析系统,其特征在于,

所述靶固定面具有:

多个信号产生部,其通过金-硫(Au-S)键与所述靶固定面的表面进行连接,在所述表面形成自组装单分子层;

1个以上的连接部,其结合在所述靶固定面的表面;以及

捕获子,其连接在所述连接部,通过共价键或非共价键固定靶分子,

其中,所述信号产生部为在所述金颗粒的质量分析过程中从所述金纳米颗粒游离而生成多个质量有别于靶分子和所述金颗粒的信号产生部的大小的有机阳离子的有机分子。

5. 根据权利要求4所述的靶分子的分析系统,其特征在于,所述靶固定面的信号产生部含有醚末端部和连接在所述醚末端部且结合在所述金颗粒的表面的烷烃硫醇部。

6. 根据权利要求5所述的靶分子的分析系统,其特征在于,所述醚末端部含有1个以上乙二醇单元。

7. 根据权利要求4所述的靶分子的分析系统,其特征在于,所述金颗粒的捕获子和所述靶固定面的捕获子为与所述靶分子特异性结合的不同抗体或互不相同抗体。

8. 一种靶分子的质量分析检测方法,其为使用质量分析来检测试样中是否存在靶分子的方法,所述方法包括如下阶段:

(i) 使所述试样和所述金颗粒与在固相支撑体的表面固定有用于结合所述靶分子的捕获子的捕获固定面相互接触,生成捕获混合物的阶段;

(ii) 从所述捕获混合物除去非特异性结合的金颗粒的分选阶段;以及

(iii) 所述第(ii)阶段结束后,对捕获混合物中残存的金颗粒进行质量分析的阶段,

其中,所述金颗粒是用于捕获靶分子和放大质量分析信号的金颗粒,其为表面经有机分子改性的金颗粒,所述金颗粒具有:

多个信号产生部,其连接在所述金颗粒的表面,在所述表面形成自组装单分子层;

1个以上的连接部,其结合在所述金颗粒的表面;以及

捕获子,其连接在所述连接部,与靶分子特异性结合或者发生特异性反应,

其中,所述信号产生部为在所述金颗粒的质量分析过程中从所述金纳米颗粒游离而生成多个质量有别于靶分子的大小的有机阳离子的有机分子。

9. 根据权利要求 8 所述的靶分子的质量分析检测方法,其特征在于,所述除去非特异性结合的金颗粒的阶段包括洗涤所述捕获混合物的步骤。

10. 根据权利要求 8 所述的靶分子的质量分析检测方法,其特征在于,所述质量分析通过 i) 对所述捕获混合物进行无基质方式的激光解吸电离;或 ii)

基质辅助激光解吸电离-飞行时间质量分析中的一种而进行。

11. 根据权利要求 8 所述的靶分子的质量分析检测方法,其特征在于,在所述捕获混合物的分选阶段和质量分析阶段之间,还包括从所述分选得到的捕获混合物中分离金颗粒的阶段,其中,所述质量分析阶段以所述分离出的金颗粒为对象。

新的质量分析信号的放大技术

技术领域

[0001] 本发明涉及利用质量分析检测靶分子的技术。更具体而言,本发明涉及一种新的信号放大方法,该方法使用通过低分子量有机分子进行表面修饰 (surface-modified) 的金颗粒来检测生物分子等靶分子。

背景技术

[0002] 在人类平均寿命延长的同时,出生率不断下降,因而人口老龄化不断加剧;此外,一方面,由于肥胖者、患有生活习惯病的人的增加,准确诊断生活习惯病、慢性疾病等复杂疾病并有效预防和治疗日益得到重视。作为疾病等的诊断中重要的线索的生物分子、即生物标记 (biomarker) 大部分以极低的浓度存在于体内或试样中,因此需要具有超高灵敏度 (ultra high sensitivity) 的检测方法。目前已知的多种测定方法,在灵敏度方面显示出优异的结果,但基本在下面这些方面并不令人满意,或者尚存改善的余地。

[0003] (1) 是否不仅能够用于特定疾病、特定试样而且能够作为通用的生物学信号放大方法使用?

[0004] (2) 实验方法总体上是否容易?

[0005] (3) 非选择性吸附导致的假信号的放大是否易于消除?

[0006] (4) 在进行数量较多的实验时,是否存在费用方面的问题?

[0007] 上述因素对于由有限量的试样获得精密的分析结果进而进行准确的诊断而言,均为重要的条件。因此,从这种意义上来说,如果开发出一种能够同时对多种疾病标记物进行比较分析的测定方法,则将能够克服目前的 ELISA 等分析方法 (即,每次必须仅对 1 个标记物进行分析的诊断方法) 的局限。

[0008] 质量分析法通过对核酸、蛋白质、肽、糖等生物分子以及通常的有机分子的质量和信号强度进行测定,从而能够准确获知作为分析对象的靶分子的种类和量。质量分析不限于特定作用基团的存在,因此理论上来说可应用的分子的范围较宽,利用质量分析常常能够同时且准确地分析复杂试样中的多种靶分子,因此,例如,能够用于多种疾病标记物的同时分析和诊断中。

[0009] 质量分析根据试样的电离和离子的检测方式而存在多种类型,上述质量分析法中,基质辅助激光解吸电离-飞行时间 (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time-of-Flight, MALDI-TOF) 方法被广泛用于生物体试样的质量分析中。已知 MALDI-TOF 方式的质量分析法是用于必须迅速测定多个试样的超高速诊断中的最优选的质量分析法。然而,通过 MALDI-TOF 方法直接测定靶分子质量,因灵敏度低而存在难以测定微量的生物标记的局限。此外,目前的现状是,不仅需要关于生物标记是否存在的信息,还需要关于其量的信息,仅通过目前所使用的 MALDI-TOF 方法对此而言并不充分。因此,迫切需要开发用于克服该问题的 MALDI-TOF 高灵敏度定量法、甚至并非基质辅助方式时也能对微量生物分子进行定量分析的、能够放大信号的质量分析方法。

发明内容

[0010] 发明要解决的问题

[0011] 本发明是鉴于上述情况而作出的,其目的在于设计一种系统,其能由 1 个靶分子放出被放大至数千或数万倍的质量分析信号;以及用于其的方法。

[0012] 解决问题的手段

[0013] 为解决这一技术问题,本发明中提供一种表面通过信号产生用低分子化合物修饰的、用于捕获靶分子和放大信号的金颗粒;使用其的分析系统以及使用前述金颗粒和分析系统的靶分子的分析方法。

[0014] 在本发明的一个方面,前述金颗粒具有信号产生部、连接部(linker)和捕获子。多个前述信号产生部连接在前述金颗粒的表面,在前述表面形成自组装单分子层(self assembled monolayer)。前述连接部的一端结合在前述金颗粒的表面,该连接部的另一端连接在与靶分子特异性结合、或特异性发生反应的捕获子上。这里,前述信号产生部为多个有机分子,在前述金颗粒的质量分析过程中,从前述金纳米颗粒游离而生成多个质量有别于靶分子的大小的有机阳离子。

[0015] 本发明的一个实施方式中,前述信号产生部,一端部通过金-硫(Au-S)键结合在前述金颗粒的表面,具有另一侧的醚末端部、以及连接在前述醚末端部且与前述金颗粒的表面结合的烷烃硫醇部。这里,前述醚末端部优选含有 1 个以上乙二醇单元。本发明的一个实施方式中,前述金颗粒通过激光解吸电离-飞行时间方式的质量分析而产生前述信号产生部的质量信号。

[0016] 本发明的另一方式中,提供一种分析系统,该系统含有前述金颗粒和能够将分析对象试样固定于表面的靶固定面。此时,前述靶固定面特征在于:具有固相的支撑体,能够通过共价键或非共价键将用于分析是否存在靶分子的试样固定在前述支撑体的表面上。本发明的一个实施方式中,前述靶固定面具有:通过金-硫(Au-S)键与前述靶固定面的表面连接、在前述表面形成自组装单分子层的多个信号产生部;结合在前述靶固定面的表面的 1 个以上连接部;和结合在前述连接部、通过共价键或非共价键固定靶分子的捕获子。此时,前述信号产生部为在前述金颗粒的质量分析过程中从前述金纳米颗粒游离后生成多个质量有别于靶分子和前述金颗粒的信号产生部的大小的有机阳离子的有机分子。

[0017] 本发明的再一方式中,提供一种使用前述金颗粒来分析试样中的靶分子的方法。该方法包括下述阶段:使分析是否存在靶分子的试样和捕获固定面相互接触而生成捕获混合物的结合阶段;由前述捕获混合物除去非特异性结合的金颗粒的分选阶段;以及,前述分选阶段结束后,对捕获混合物中残存的金颗粒进行质量分析的阶段。此时,关于前述捕获固定面而言,用于与靶分子结合的前述捕获子被固定在前述金颗粒表面的固相支撑体上。此时,前述质量分析既可以是以前述捕获混合物为对象的无基质方式的激光解吸电离质量分析;也可以是常规 MALDI-TOF 质量分析。此外,也可以在前述分选阶段和质量分析阶段之间从捕获混合物中分离结合后的金颗粒,仅对该金颗粒进行质量分析。

[0018] 发明效果

[0019] 使用本发明的质量分析信号的放大系统和所述方法,不必进行预处理即可将作为分析对象的靶分子的质量分析信号特异性放大,发挥能够不受其它物质的影响而进行定量测定的效果。

附图说明

[0020] 图 1 为举出具体的一个实施方式并将本发明涉及的质量信号的放大原理图形化的图,表示采用 AM- 质量标记作为信号产生部的质量分析系统的分析过程。

[0021] 图 2 是能够用于本发明的金颗粒或靶固定面的信号产生部的具体的一个实施方式,表示能够通过硫-金键将自身固定于金的表面的 AM- 质量标记分子的结构式。

[0022] 图 3 是表示用图 2 的 AM- 质量标记 1 和 AM- 质量标记 2 在金颗粒或靶固定面的表面形成自组装单分子层 (SAM) 后的形态的图。图 3 表示起连接部作用的 AM- 质量标记 2 未与捕获子连接的状态。

[0023] 图 4 表示的是:对通过实施例 2 而在表面连接 AM- 质量标记 1 和 AM- 质量标记 2 但未连接捕获子的金颗粒上自组装单分子层的形成情况进行质量分析的质谱。

[0024] 图 5 表示能够确认在固定有谷胱甘肽靶分子的靶固定面的表面形成 SAM 的 MALDI-TOF 谱。

[0025] 图 6 为表示在固定有谷胱甘肽靶分子的靶固定面的形成过程中、在各阶段 AM- 质量标记分子形成 SAM 的质谱。图 6 的 (a) 和图 6 的 (c) 为生物素靶固定面的分析结果,图 6 的 (b) 和图 6 的 (d) 为谷胱甘肽 (GSH) 靶固定面的分析结果,图表内的百分率表示靶固定面的表面处靶分子的高精度。

[0026] 图 7 为用于证明本发明涉及的 AM- 质量标记产生特异性质量信号的对照组实验。图 7 的 (a) 为使固定有生物素靶分子的靶固定面和具有中性链亲和素 (neutravidin) 捕获子的金颗粒反应的情况的质谱,图 7 的 (b) 为使固定有生物素靶分子的靶固定面和具有肌红蛋白捕获子的金颗粒反应的情况的质谱,图 7 的 (c) 为使未固定生物素的靶固定面和具有中性链亲和素捕获子的金颗粒反应的质谱。

[0027] 图 8 为用于证明本发明涉及的 AM- 质量标记产生特异性质量信号的对照组实验。图 8 的 (a) 为对形成有图 2 的 AM- 质量标记 1 的 SAM 的 SAM 金板进行 MALDI-TOF 分析的质谱,图 8 的 (b) 为对同样的 SAM 金板在不形成基质下进行激光解吸电离分析的谱图,图 8 的 (c) 为使同样的 SAM 金板与形成有 AM- 质量标记 5 的 SAM 的金颗粒反应的质谱。

[0028] 图 9 为在液体状态下对 AFP 靶分子或脂联素靶分子进行质量分析的结果的质谱。

具体实施方式

[0029] 本发明要实现的核心技术是,对金颗粒进行表面改性而使其能够与靶分子 (target molecule) 选择性结合,然后通过对用前述金颗粒修饰过的低分子化合物进行质量分析来检测与靶分子的相互作用,是一种通过多个低分子化合物检测出 1 个靶分子的形式的新信号放大方法。

[0030] 本发明的用于捕获靶分子和放大信号的金颗粒,其表面经有机分子改性、用低分子量有机分子进行了修饰。该改性的金颗粒具有信号产生部、连接部和捕获子。本发明的金颗粒中,捕获子为与靶分子特异性结合的部分,连接部的一端连接在前述捕获子上,另一端连接在前述金颗粒上。另一方面,信号产生部为有机分子,为了信号的放大而在金颗粒的表面结合有多个,在质量分析过程中由于激光等而从金颗粒游离,生成有别于靶分子的有机阳离子。本发明中,形成前述信号产生部的有机分子形成自组装单分子层 (SAM)。如后所

述,使用自组装单分子层的话,即使省略基质的形成也能够检测质量信号。此外,形成 SAM 的话,能够将生物学标记稳定且容易地连接在珠上。

[0031] 本发明的金颗粒特征在于,由于含有数量远多于捕获子的信号产生部,因此即使存在存在于微量试样或痕量试样中的仅仅 1 个靶分子被 1 个金颗粒捕获的情况下,在质量分析过程中,通过检测由前述金颗粒产生的多个信号产生部分或其片段(fragment)而被放大的 2 次质量信号,能够提高分析的灵敏度。

[0032] 图 1 为例举本发明的部分实施方式的例子并将其原理图形化的图,表示将信号产生部作为质量标记(mass tag)的信号放大方式。图 1 的(a)为使用用于捕获靶分子和放大信号的本发明的金颗粒来检测靶分子的一个实施方式。图 1 的(a)的最左侧的示意图表示具有能够固定靶分子的表面的固相支撑体。实施在该固相支撑体上固定靶分子(用空心圆表示)的预处理后(图 1 的(a)左侧起第 2 个示意图),对其加入多种本发明涉及的金颗粒(左侧起第 3 个示意图)。图 1 中,本发明的金颗粒用具有弯曲的带状突起的大的空心圆来表示。该示意图中,连接在圆上的呈放射状的突起表示信号产生部,黑色半圆状或 V 字状部分表示捕获子,将捕获子和大的空心圆连接在一起的部分表示连接部。前述金颗粒中,仅分选出与靶分子特异性结合的产物,并留下该产物(图 1 的(a)左侧起第 4 个示意图)。接着,关于该分选出的金颗粒而言,在质量分析过程中由于电离激光等从金颗粒脱离(左侧起第 5 个示意图),从而产生质量分析信号(图 1 的(a)的最后的示意图)。

[0033] 另一方面,作为本发明另一实施方式的图 1 的(b)中,未实施图 1 的(a)那样的靶分子的固定化预处理。图 1 的(b)中,将前述金颗粒和固相支撑体、以及未固定的靶分子试样混合并培养,不需要进行预处理(图 1 的(b)的最左侧的示意图)。加入含有靶分子和其它分子的试样后进行分选的话,仅使前述金颗粒、靶分子、支撑体结合而成的产物留下(左侧起第 2 个示意图)。然后,该金颗粒-靶分子-支撑体能够经过与图 1 的(a)同样的步骤而产生质量分析信号。

[0034] 本发明的金颗粒的大小没有特别限制,可根据用途选择适当大小。即,可以是纳米级别的纳米颗粒,也可以是微米级别的微米颗粒。例如,为纳米颗粒的情况下,在想要区分细胞表面这类具有微细表面结构的对象的结构时很有利;微米颗粒的情况下,具有胶体状态下安全性高、表面改性容易的优点,每个颗粒表面能连接的信号产生部数目增加,具有信号的放大更显著的优点。

[0035] 本发明中,用前述金颗粒分析的靶分子和用于特异性捕获该靶分子的捕获子没有特别限制。只要是能通过特异性的相互作用例如氢键进行捕获或能通过高度选择性的化学反应进行捕获的靶分子和捕获子,则均是本发明的应用对象。因此,满足该条件的所有有机分子、无机分子、生物分子、大分子均可作为靶分子。例如,在类似于生物素(biotin)和亲和素(avidin)、小型配体和其蛋白受体这样的情况下,可以以小型有机分子为靶分子、以其特异性结合的蛋白质作为捕获子。当然,也可以是靶分子为蛋白质、捕获子为小型有机分子这样的构成。或者,还可以是冠醚(crown ether)或穴状配体(cryptand)以及与其特异性结合的阳离子这样的、靶分子为无机离子而捕获子是有机分子的构成。此外,还可以是酶和其非可逆性抑制剂(irreversible inhibitor)的情况(例如,沙林(sarin)等有机磷化合物和乙酰胆碱酯酶(acetylcholinesterase))这样的、捕获子和靶分子之间发生特异性化学反应而通过共价键相互连接这样的构成。

[0036] 生物分子的情况下,存在显示特异性结合 (specific binding) 特性的多种例子,因此其为本发明的靶分子的 1 个优选例子。生物分子之中,所有生物分子、例如蛋白质、肽、核酸、碳水化合物、脂质、碳水化合物-蛋白质缀合物 (carbohydrate-protein conjugate)、脂质-蛋白质缀合物均可作为其对象。

[0037] 本发明的信号产生部,并非是形成自组装单分子层的巨大分子,而是有机分子。形成自组装单分子层 (SAM) 的分子可通过多种长度和化学物质来制作,因此对于多种生物学的靶,可生成质量值存在差异的多种 SAM 形成分子而进行区别。如上所述,本发明中,将用作信号放大用途的 SAM 分子简称为放大质量标记 (amplifying mass tag) 或将其简称为 AM- 质量标记。

[0038] 本发明的一个实施方式中,前述信号产生部的一端部为烷烃硫醇 (alkanethiol) 部位,通过金-硫 (Au-S) 键结合在所述金颗粒的表面,在其另一侧具有醚末端部。本发明的更具体的实施方式中,该醚末端部优选具有 1 个以上乙二醇重复单元。由乙二醇重复单元构成的醚末端部能够抑制非特异性的蛋白质吸附。该具有乙二醇重复单元的 AM- 质量标记分子的例子如图 2 所示。包含图 2 所示分子的本发明涉及的 AM- 质量标记在 MALDI-TOF 质量分析等激光解吸电离方式的质量分析时,特别易于从金颗粒脱离并产生质量分析信号。

[0039] 如图 1 和图 2 所示,本发明中,对每种靶分子能够对应于选择不同的捕获子和不同的 AM- 质量标记的金颗粒。使用这样的多种金颗粒能够同时多通道 (multiplex) 地分析多种靶分子。由于质量分析能够容易地分析微细的质量差异,因此适于多重分析。

[0040] 本发明的另一方面中,提供含有该金颗粒靶分子的分析系统。该分析系统含有前述金颗粒和能够在表面固定分析对象试样的靶固定面。此时,特征在于,前述靶固定面具有固相的支撑体,前述支撑体的表面能够通过共价键或非共价键固定用于分析是否存在靶分子的试样。该靶分子的分析系统,如图 1 的 (a) 所示,可以实施在靶固定面固定试样的预处理后进行利用;如图 1 的 (b) 所示,也可以不进行预处理而进行利用。本发明的分析系统中,靶固定面具有将靶分子固定在固相的支撑体上的手段,为此,也可对支撑体的表面进行改性。靶分子的固定手段优选为特异性的,但只要本发明涉及的金颗粒的捕获子能够与靶分子特异性结合,也可以不必为特异性的。在靶固定面的支撑体的表面上固定靶分子的方式,可以使用使靶分子和表面或改性表面之间形成共价键、或非共价键(例如,氢键等利用分子间的力的结合)而进行固定的方式中的任意一种。

[0041] 本发明的分析系统中,前述靶固定面中支撑体的原材料可使用常规材料、即玻璃、硅、金属、半导体或塑料,某些特定的实施方式中,前述靶固定面也可以是固定有从含有靶分子的、规定生物体试样获得的其它生物分子的生物芯片。例如,可以通过形成非特异性共价键而在表面固定有从特定状态的细胞获得的细胞裂解液 (cell lysate) 试样中的蛋白质的生物芯片。

[0042] 本发明的一个实施方式中,前述靶固定面可以与前述金颗粒同样地具有低分子量有机分子的自组装单分子层和捕获子。即,前述靶固定面可具有:通过金-硫 (Au-S) 键与前述靶固定面的表面连接、在前述表面形成自组装单分子层的多个信号产生部;结合在前述靶固定面的表面的 1 个以上连接部;以及结合在前述连接部、通过共价键或非共价键固定靶分子的捕获子。此时,前述信号产生部特征在于,其为如下的有机分子 (AM- 质量标记): 在前述金颗粒的质量分析过程中从前述金纳米颗粒游离,生成多个质量有别于靶分子和前

述金颗粒的信号产生部的大小的有机阳离子。本发明的更具体方式中,关于前述金颗粒和前述靶固定面而言,虽具有具备烷烃硫醇部和乙二醇重复单元的信号产生部的单层,但采用不同的信号产生部分子、即 AM 分子,使用与同一个靶分子特异性结合的不同抗体作为捕获子。

[0043] 本发明另一方式中,提供使用这样的靶固定面和金颗粒来分析试样中的靶分子的方法。如前述图 1 的 (a) 所示,伴有试样的预处理的方法包含如下的阶段。

[0044] (i) 使试样与固相的支撑体接触而获得前述固相支撑体的表面上固定有试样中的物质(靶分子或其它物质)的靶固定面的阶段;

[0045] (ii) 在连接在本发明的金颗粒的捕获子可与靶分子特异性结合的条件下,使权利要求 1 ~ 8 中任意一项的金颗粒和前述靶固定面接触而生成捕获混合物的阶段;

[0046] (iii) 从前述捕获混合物中除去非特异性结合的金颗粒的分选阶段;以及

[0047] (iv) 前述第 (iii) 阶段结束后,对捕获混合物中残存的金颗粒进行质量分析的阶段。

[0048] 另一方面,不将试样固定在靶固定面上,而是将金颗粒和试样与靶固定面同时培养使其结合的方法包括下述阶段。

[0049] (i) 使试样和权利要求 1 ~ 8 中任意一项的金颗粒与在固相支撑体的表面固定有用于结合前述靶分子的捕获子的捕获固定面相互接触,生成捕获混合物的阶段;

[0050] (ii) 从前述捕获混合物除去非特异性结合的金颗粒的分选阶段;以及

[0051] (iii) 前述 (ii) 阶段结束后,对捕获混合物中残存的金颗粒进行质量分析的阶段。

[0052] 本发明的靶分子的质量分析由于利用了信号的放大,因此具有如下的有利特征:不仅灵敏度高,而且通过能被质谱仪检测到的信号产生部的 2 次信号的强度还能够进行靶分子的定量。为进行定量分析,可利用用量已知的内标物(internal standard)和与其相应的金颗粒的方法。

[0053] 本发明的靶分子的分析方法具有如下的优点,即,对于通过试样将金颗粒和靶固定面连接的状态的捕获混合物、尤其是经过了分选而除去非特异性结合在靶固定面的金颗粒的捕获混合物,可不进行其它处理过程而直接使用。本发明的信号产生部(即 AM- 质量标记)通过激光解吸电离,从捕获混合物直接被分离并生成产生质量分析信号的阳离子。常规激光解吸电离质量分析中,使用基质辅助激光解吸电离(MALDI)的方式,即,将基质形成物质和试样混合而形成基质后,对该基质照射激光使分析对象物质解吸、电离。然而,本发明的分析方法中,不必形成这样的基质,分选结束后的捕获混合物可直接加入到激光解吸电离质谱仪中,因此能够省略不必要的过程。本发明的金颗粒支持多重分析,在前述的基础上经过最低限度的分选过程后,无需进行其它的试样处理就能够直接进行质量分析,因此,本发明的分析方法还适合高速分析(high-throughput assay)。另一方面,本发明的分析方法中,也可以通过常规 MALDI-TOF 方式分析捕获混合物,即,在质量分析之前,可以增加使捕获混合物形成基质的阶段。

[0054] 本发明的分析方法中,质量分析方式没有特别限定,可使用在质谱装置内能够使信号产生部从金颗粒游离的所有质量分析方法。其中,如前所述,激光解吸电离质量分析能够由本发明的金颗粒容易地产生质量分析信号,是尤其适合生物分子试样的电离的方式。

激光解吸电离质量分析中,最常用的是MALDI-TOF方式。销售的质谱装置基本是将MALDI电离和TOF离子检测方式结合,但未必需要限定为TOF检测方式。此外,还可以在质量分析阶段之前,增加由分选结束后的捕获混合物仅分离特异性结合的金颗粒或结合在一起的金颗粒-试样的阶段。如上所述,仅分离金颗粒的情况下,不仅激光解吸电离方式中、其它电离方式的质谱装置中也能够应用本发明。

[0055] 普通的MALDI-TOF质量分析的检测限为数皮摩(picomole),若利用本发明中公开的信号放大方式的分析方法,则对 10^{-15} 摩尔(attomole)以下的痕量试样也能进行检测。

[0056] 实施例

[0057] 下面举出实施例对本发明进行更详细的说明。下述的实施例、合成例等为本发明的例示,用于详细进行说明,任意情况下均非出于限定本发明的目的。

[0058] <实施例1>AM分子的合成

[0059] 第1阶段:AM-质量标记的合成

[0060] 对具有长烷基的长链硫醇(long chain thiol)部分结合多种长度的乙二醇(ethylene glycol)重复单元,合成如图2所示的具有多种质量值的AM-质量标记。

[0061] <实施例2>具有捕获子的金颗粒的制造

[0062] 在本发明涉及的一具体实施方式中,制造了具有捕获子的金颗粒。该颗粒的结构为,在由AM-质量标记构成的自组装单分子层中含有连接部和捕获子。如表1所示,制备了5种金颗粒。

[0063] 表1

[0064]

ID	靶分子	捕获子
金颗粒1	谷胱甘肽 (glutathione、GSH)	谷胱甘肽-S-转移酶 (glutathione-S-transferase、GST)
金颗粒2	生物素 (biotin)	中性链亲和素 (neutravidin)
金颗粒3	甲胎蛋白 (α -fetoprotein、AFP)	AFP-特异性多克隆抗体 D
金颗粒4	脂联素 (adiponectin)	脂联素-特异性单克隆抗体 1
金颗粒5	-	肌红蛋白

[0065] AFP的多克隆抗体使用英国的Abcam制的ab8201,单克隆抗体使用ab3980。脂联素的多克隆抗体使用美国的R&D systems制的MAB1065,单克隆抗体使用MAB10651。

[0066] 前述金颗粒的信号产生部,通过硫-金键使图2所示的AM-质量标记1连接到金颗粒;连接部同样通过硫-金键使图2所示的AM-质量标记2连接到颗粒的表面。图3示意出:在使捕获子蛋白质结合到连接部前,形成AM-质量标记1的自组装单分子层(SAM)的形态,完成状态的金颗粒通过肽键将起连接部作用的AM-质量标记2的羧基末端和捕获子蛋白质的氨基连接而成。

[0067] 第1阶段:在金颗粒的表面形成自组装单分子层(SAM)

[0068] ①将平均粒径 $2\mu\text{m}$ 的金颗粒(gold bead、韩国的Nomadien制)1mg用无水乙醇(absolute ethanol)洗涤后,离心分离2分钟左右,然后除去其上清液。重复3次该过程。

[0069] ②将前述金颗粒悬浮液用超声波处理(sonication)5分钟后,用无水乙醇洗涤,

离心分离 2 分钟后,除去其上清液。重复 3 次该过程。

[0070] ③将图 2 所示的 AM- 质量标记 1(起信号产生部作用)的 1mM 无水乙醇溶液和 AM- 质量标记 2(起连接部作用)的 1mM 无水乙醇溶液按照体积比 1 : 99 的比例混合。

[0071] ④在前述②的金颗粒中混合前述①的混合溶液 1mL 后,使用转子(rotator)在暗处反应 1 天(约 12 小时以上)。

[0072] ⑤将前述反应混合物离心分离 5 分钟左右,然后除去其上清液。

[0073] ⑥混合无水乙醇 1mL 后,离心分离约 3 分钟,然后除去其上清液。重复 5 次该过程。然后,将产物加入无水乙醇中,于 -20°C 下保管。

[0074] 图 4 为用于确认金颗粒的表面形成 AM- 质量标记 1 的自组装单分子层(SAM)的 MALDI-TOF 质谱。如下述实施例 8 所述,图 4 的质量分析使用 DHB 作为基质来实施。图 4 的质量分析中, $(s\text{-EG}_3\text{-OH})_2\text{Na}^+$ 所示的最强峰($m/z = 694.183$)为 AM- 质量标记 1 的烷烃硫醇部位形成二硫化物(disulfide、S-S 键)的分子上结合了钠离子而成的离子物种。图 4 中,除此以外还观察到 AM- 质量标记 2 和 1 结合的离子,质谱充分支持了在金颗粒的表面形成了以 AM- 质量标记 1 为主化学物种的 SAM 这一结论。

[0075] 第 2 阶段:捕获子与金颗粒的结合

[0076] 通过形成肽键,使前述表 1 所示的 5 种捕获子蛋白质结合到第 1 阶段中获得的、连接在金颗粒的表面的 AM- 质量标记 2 的 COOH 末端。

[0077] ①将形成有 1%的 AM- 质量标记 2/99%的 AM- 质量标记 1 的单层的金颗粒转移至 PCR 管,离心分离后,除去其上清液。

[0078] ②与二氯甲烷(Methylene chloride)100 μL 混合后,离心分离($5000\times g$,5 分钟),除去其上清液。重复 3 次该过程。

[0079] ③将 N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)溶液(二氯甲烷中,5mg/mL)50 μL 与前述离心分离获得的金颗粒混合后,反应 3 分钟。

[0080] ④向其中混合 1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺(EDC)溶液(二氯甲烷中,20mg/mL)20 μL 后,常温下反应 2 小时。

[0081] ⑤用离心机离心($5000\times g$,5 分钟),除去其上清液。

[0082] ⑥在前述金颗粒中混合 100 μL 的二氯甲烷后,用离心机离心($5000\times g$,5 分钟),除去其上清液。重复 5 次该过程。

[0083] ⑦将用于连接到连接部的捕获子蛋白质的 10 μL 的 PBS 溶液各 50 μL 加入到前述颗粒中,混合后,常温下反应 1 小时。捕获子蛋白质分别为 GST 和肌红蛋白(美国的 Sigma Aldrich 制)、中性链亲和素(美国的 Pierce Biotech 制)、AFP-特异性单克隆抗体和多克隆抗体(英国的 Abcam 制)、脂联素-特异性单克隆抗体 1(美国的 R&D systems 制)。

[0084] ⑧用离心机离心($5000\times g$,5 分钟),除去其上清液。

[0085] ⑨在金颗粒中混合 PBS 后,用离心机离心($5000\times g$,5 分钟),除去其上清液,将上述过程重复 2 次后,转移到管中。

[0086] ⑩加入到无水乙醇中而获得完成状态的金颗粒,在使用之前于 -20°C 保管。

[0087] <实施例 3> 预先固定有捕获分子的靶固定面的准备

[0088] 制造通过化学键固定有生物素或谷胱甘肽靶分子的靶固定面。

[0089] 捕获有谷胱甘肽靶分子的靶固定面的制造

[0090] ①在硅晶片的表面真空沉积钛(100 Å)后,沉积金(900 Å),制作镀金板。将该镀金板裁切成适当大小、例如,宽×长为5×5mm的大小。

[0091] ②将AM-质量标记1的1mM无水乙醇溶液和图2的AM-质量标记3的1mM无水乙醇溶液按照期望的体积比例(从约90:10至99.999999:0.000001)混合。

[0092] ③在②阶段中制备的乙醇溶液中浸渍前述镀金板后,在暗处反应1天,形成自组装单分子层(SAM)。

[0093] ④在如上所述制得的SAM金板上散布无水乙醇而洗涤后,用氮气(N₂)干燥。

[0094] ⑤使用将DMSO和PBS按照1:1(v/v)混合而成的溶液,制备50mM的N-琥珀酰亚胺3-马来酰亚胺丙酸酯(N-succinimidyl 3-maleimidopropionate)溶液。

[0095] ⑥在SAM金板上放置50mM的N-琥珀酰亚胺3-马来酰亚胺丙酸酯(N-succinimidyl 3-maleimidopropionate)溶液10 μL,在常温下反应4小时,制造马来酰亚胺SAM金板。

[0096] ⑦使用DMSO/PBS(1:1)溶液轻轻洗涤马来酰亚胺SAM金板。

[0097] ⑧散布无水乙醇而洗涤后,用N₂气干燥。

[0098] ⑨在马来酰亚胺SAM金板上放置50mM的谷胱甘肽(PBS溶液)10 μL,在常温下反应2小时,制造GSH SAM金板。

[0099] ⑩用PBS轻轻洗涤反应后的GSH SAM金板。

[0100] ⑪散布无水乙醇而洗涤后,用N₂气干燥。

[0101] 图5所示的质谱依次为前述第④阶段结束时的SAM金板(1%的NH₂ SAM金板)、马来酰亚胺SAM金板(1%的马来酰亚胺SAM金板)和GSH SAM金板的MALDI-TOF分析结果,表明在前述金板的表面形成有SAM。第④阶段结束时的SAM金板中,与图4同样可观测到两分子AM-质量标记1间的二硫化物即(s-EG₃-OH)₂+Na⁺离子。1%的马来酰亚胺SAM金板中,可观测到AM-质量标记1以及马来酰亚胺连接在AM-质量标记3上形成的分子间的二硫化物即离子物种(s-EG₃-OH)-(s-EG₅-马来酰亚胺)+Na⁺。1%的GSHSAM金板中,可观测到最终连接有生物素靶分子的AM-质量标记3和AM-质量标记1间的二硫化物即(s-EG₃-OH)-(s-EG₅-GSH)+Na⁺。

[0102] 捕获有生物素靶分子的靶固定面的制造

[0103] 使用50mM的磺酸基琥珀酰亚胺-6-(生物素酰胺)己酸酯(sulfosuccinimidyl-6-(biotinamido)hexanoate)PBS溶液10 μL代替前述N-琥珀酰亚胺3-马来酰亚胺丙酸酯,除此以外,通过与谷胱甘肽靶分子固定面相同的方法制造。

[0104] <实施例4>固定有靶分子的靶固定面的质量分析

[0105] 通过实施例2中制造的具有GST捕获子的金颗粒(表1的金颗粒1),分析实施例3中制造的固定有GSH靶分子的靶固定面;通过具有中性链亲和素捕获子的金颗粒(表1的金颗粒2),分析生物素靶固定面。将1mg的中性链亲和素或GST金颗粒悬浮于100 μL的PBS中后,将10 μL该悬浮液加入到生物素或GSH靶固定面。5分钟后,将靶固定面用PBS和蒸馏水洗涤后,用氮气流干燥,进行质量分析。

[0106] 图6为表示该质量分析结果的质谱。图6的(a)和图6的(c)为对生物素靶固定面进行分析的实验,图6的(b)和图6的(d)为对谷胱甘肽(GSH)靶固定面进行分析的实验。图6的质谱中,图表内的百分率表示整个靶固定面的靶分子的固定密度,该固定密度的

值,可在前述实施例 3 中制造靶固定面时调节连接有靶分子的 AM- 质量标记 3 和 AM- 质量标记 1 的比例的阶段(即,实施例 3 的第②阶段),通过调节质量标记间的混合比例来规定。

[0107] 图 6 的 (a) 是不使用具有中性链亲和素捕获子的金颗粒、而将游离的中性链亲和素直接结合到生物素靶固定面后对其进行常规 MALDI-TOF 分析的质谱。在生物素的固定密度为 1% 时,可观测到中性链亲和素蛋白质的质量信号 (14.6kDa),低于该值则难以观测到。由此可知,不使用本发明涉及的金颗粒的直接蛋白质分析中,就靶分子的固定密度而言,1% 水平即是观测下限值。图 6 的 (c) 的实验中,使用本发明涉及的金颗粒(表 1 的金颗粒 2),进行了无基质方式的激光解吸电离-TOF 分析。结果,在图 7 的 (c) 的实验中,即使是 $10^{-6}\%$ 这一较低的固定密度下也能观测到来自金颗粒表面的 AM- 质量标记 1 的二硫化物的峰(即 693.2 信号),明确可知信号放大效果极其优异。

[0108] 谷胱甘肽 (GSH) 靶固定面的分析结果也与上述类似。图 6 的 (b) 为通过谷胱甘肽-S-转移酶蛋白质 (GST、27.0kDa) 对谷胱甘肽靶固定面直接进行 MALDI-TOF 分析的结果。可知仅 5% 以上的表面固定有 GSH 靶分子时能观察到 GST 质量信号。在以使用了本发明的金颗粒(表 1 的颗粒 1) 的无基质方式进行质量分析的图 6 的 (d) 中,即使是 $10^{-4}\%$ 水平的固定密度下也能观测到本发明涉及的信号产生部的 2 次信号 (693.2, 与图 6 的 (c) 同样、AM- 质量标记 1 的二硫化物)。

[0109] < 实施例 5> 信号产生的特异性:是否产生了非特异性信号

[0110] 通过实施例 4 和图 6,列举了一个具体例子有力证明了本发明的原理。本发明人等进行了如下的对照组的实验,以阐明如下的观点:图 6 的 $m/z = 693.2$ 信号并非因为靶分子和捕获子非特异性结合;也并不是不论捕获子和靶分子是否结合信号产生部都从靶固定面、金颗粒游离从而被观测到。

[0111] 图 7 的 (a) 为阳性对照组的实验,为实施例 3 中制造的生物素靶固定面与具有中性链亲和素捕获子的金颗粒反应的结果。可明确观测到 AM- 质量标记 1 的二硫化物信号 (693.2)。图 7 的 (b) 表示前述生物素靶固定面与具有肌红蛋白捕获子的金颗粒(表 1 的金颗粒 5) 反应的结果。图 7 的 (a) 和图 7 的 (b) 的信号产生部同为 AM- 质量标记 1,但在捕获子对于靶分子没有特异性的图 7 的 (b) 的情况下没有出现 693.2 信号。图 7 的 (c) 为未固定靶分子的靶固定面和中性链亲和素金颗粒反应的质量分析结果。图 7 的 (c) 中使用的靶固定面为实施例 3 的第④阶段结束时的靶固定面、即,通过 AM- 质量标记 1 和 3 形成 SAM 的靶固定面。由图 7 的结果可知,仅在反应混合物中存在捕获子和靶分子、二者间具有特异性结合性的情况下,能够观测到本发明涉及的间接的信号。

[0112] 图 7 中,由于靶固定面和金颗粒的两方共同含有 AM- 质量标记,因此难以完全排除 693.2 的信号根源并非是靶固定面。本发明人等通过下述图 8 所示的实验为阐明下述观点而进行了如下的对照组的实验,所述观点为,并非仅是来自金颗粒的信号产生部脱离就能观测到信号。即,作为靶固定面的 SAM 的构成成分使用 AM- 质量标记 1,作为金颗粒的信号产生部使用图 2 的 AM- 质量标记 5,以研究哪个质量标记作为信号被观测到。

[0113] 图 8 的 (a) 为阳性对照组的实验,为对表面具有仅 AM- 质量标记 1 的自组装单分子层的 SAM 金板进行常规 MALDI-TOF 分析(使用 DHB 作为基质,参照实施例 8) 的结果。不使用靶分子和金颗粒的上述情况下,在 MALDI-TOF 质谱中可观测到 AM- 质量标记 1 的二硫化物信号。图 8 的 (b) 为对于同样的 SAM 金板仍然不添加金颗粒、在不形成基质下进行激

光解吸电离质量分析的结果。可知：这种情况下没有观测到来源于 SAM 金板的 AM- 质量标记 1 的二硫化物信号 (693.2)。图 8 的 (c) 为对于同样的 SAM 金板添加具有 AM- 质量标记 5 的信号产生部的金颗粒、在不形成基质下进行激光解吸电离质量分析的结果。图 8 的 (c) 的质谱中,观测到来源于金颗粒的 AM- 质量标记 5 的二硫化物信号 (780.6),但未观测到来源于 SAM 金板的 693.2 信号。

[0114] 如上所述,使用本发明涉及的 AM- 质量标记的情况下,不仅能够在不形成基质下进行激光解吸电离方式的质量分析,而且能够排除来自靶固定面的非特异性信号的产生和检测,能够高度特异性地检测靶分子。本发明涉及的质量分析中,质量信号并非源自靶固定面而是来源于金颗粒的信号产生部。

[0115] < 实施例 6 > 具有抗体捕获子的靶固定面的制造

[0116] 如实施例 3、4 所述那样,制造应用前述表 1 的金颗粒 3 和 4 的靶固定面,以分析并非固定的靶分子、而是存在于液体状态的试样中的靶分子。该靶固定面中,表面具有与金颗粒不同的捕获子,作为金颗粒和靶固定面的捕获子,使用与 1 个共同的靶分子特异性结合的单克隆抗体。

[0117] 简单而言,将 AM- 质量标记 1 的乙醇溶液和 AM- 质量标记 2 的乙醇溶液按照 99 : 5 的体积比混合,在所得的溶液中浸渍金芯片 12 小时。用无水乙醇洗涤该金芯片,在氮气下干燥。将该金芯片用 NHS (20mg/mL 的 PBS 溶液) 7 μ L 和 EDC (20mg/mL 的 PBS 溶液) 3 μ L 处理 2 小时,用 PBS 洗涤后,在氮气下干燥。将该含有单克隆抗体的 3.3 μ M 的 PBS 溶液 10 μ L 加入到该金芯片上培养 1 小时后,用 PBS 洗涤后,干燥,在 4 $^{\circ}$ C 下保管。作为单克隆抗体使用抗 AFP 抗体 (与表 1 的金颗粒 3 对应) 或抗脂联素抗体 (与表 1 的金颗粒 4 对应)。

[0118] < 实施例 7 > 脂联素、AFP 靶分子的液体状态下分析

[0119] 分别对液体状态试样中的 AFP 或脂联素靶分子应用实施例 6 中制造的靶固定面和实施例 2 的金颗粒 3 或 4。简单而言,在实施例 6 的靶固定面上加入 AFP 或脂联素抗原 5 μ L,使最终的抗原浓度从 1pM 变成 1aM ($= 10^{-18}$ M)。30 分后,向其中加入具有抗体捕获子的金颗粒的悬浮液 (10mg/mL PBS 悬浮液) 10 μ L,培养 30 分钟。将该捕获混合物用 PBS 和蒸馏水洗涤,在氮气下干燥后,在不形成基质下直接进行激光解吸电离质量分析。

[0120] 图 9 表示质量分析结果。图 9 的 (a) 为将脂联素靶分子的不同单克隆抗体分别用作金颗粒和靶固定面的捕获子的情况。图 9 的 (a) 中,即使在 1aM 水平这样低的试样浓度下也能观测到来源于金颗粒的信号产生部的 693.2 信号,可知本发明具有超高灵敏度的检测特性。在以 AFP 为对象的图 9 的 (b) 的实验中,确认到至少 10aM 水平的检测限。

[0121] 如上所述,通过实施例可以确认,本发明的信号放大方式的质量分析法具有即使存在痕量水平的靶分子也能特异性地进行检测的优点。

[0122] < 实施例 8 > 靶分子的质量分析条件

[0123] 作为质量分析仪使用 AutoflexIII MALDI-TOF 质谱仪 (德国 Bruker Daltonics 制),作为电离源,使用 SmartBeam 激光。所有的质谱在 19kV 的加速电压、50Hz 的重复速度的阳性模式 (positive mode) 下测定平均 1000 次或 500 次而得。

[0124] 试样中的靶分子被捕获而得的捕获混合物不进行基质形成而直接投加到质量分析仪中。金颗粒或靶固定面中是否形成了 AM- 质量标记的自组装单分子层,在反射阳性模式 (Reflectron Positive mode) 下进行 MALDI-TOF 测定,此时使用 2,5- 二羟基苯甲酸

(DHB、5mg/mL 乙腈溶液) 作为基质。在不对 AM- 质量标记的间接信号进行确认而直接确认靶分子蛋白质的信号的实验中,在线性阳性模式 (Linear Positive mode) 下使用芥子酸 (sinapinic acid(SA), 5mg/mL 的乙腈溶液) 作为基质进行测定。

[0125] 上述列举了本发明优选实施方式的例子来说明本发明的技术思想。需要明确的是,本说明书的具体说明和实施例中使用的术语,仅仅是该领域中普通技术人员为详细说明本发明而使用的,并非局限于某种特定意思,也并非对权利要求记载的技术方案的范围进行限定。

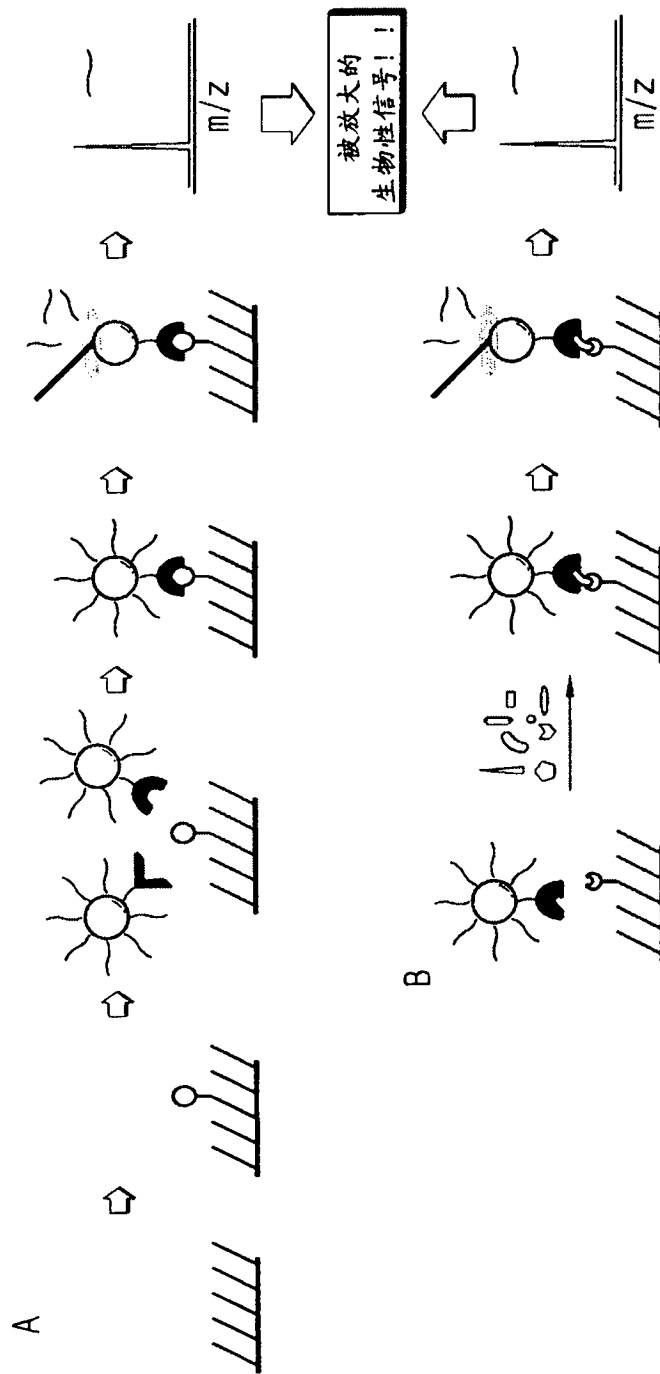


图 1

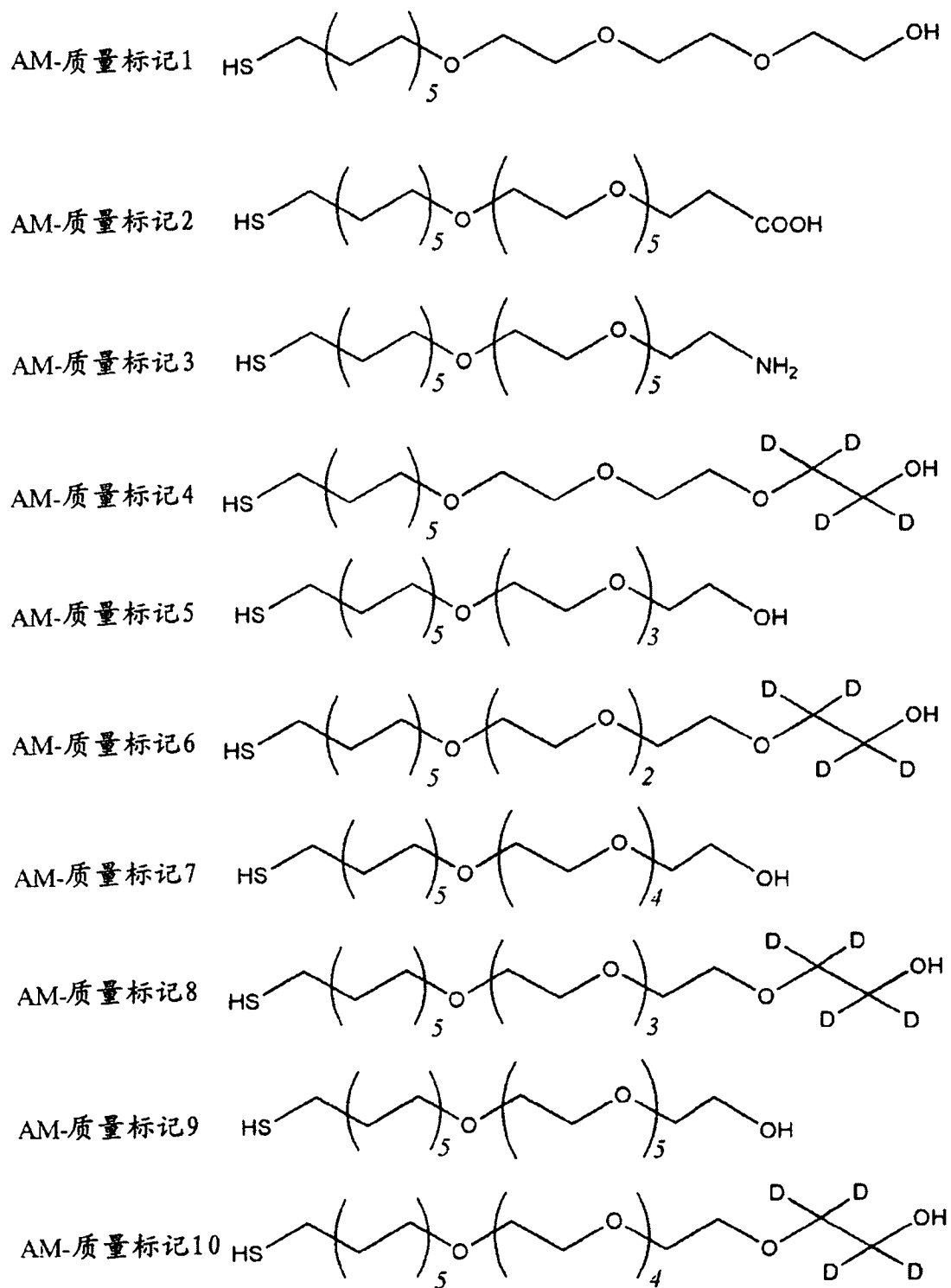


图 2

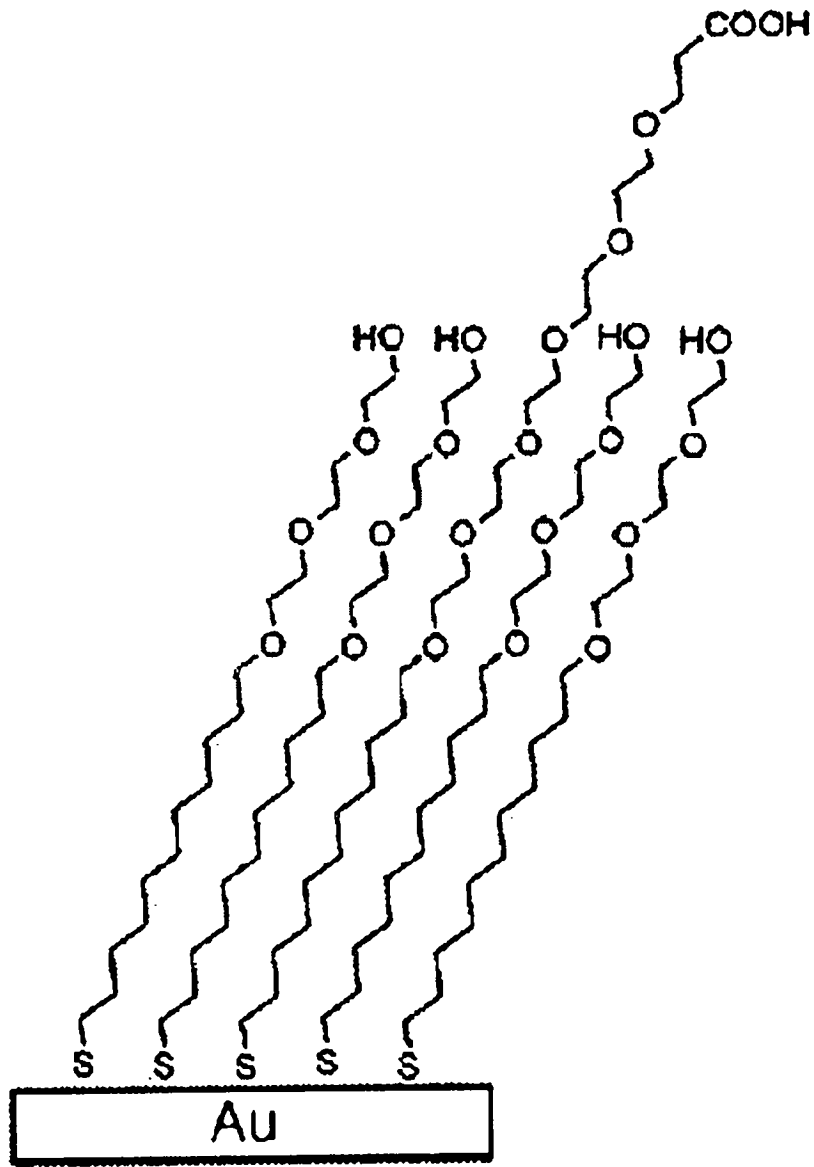


图 3

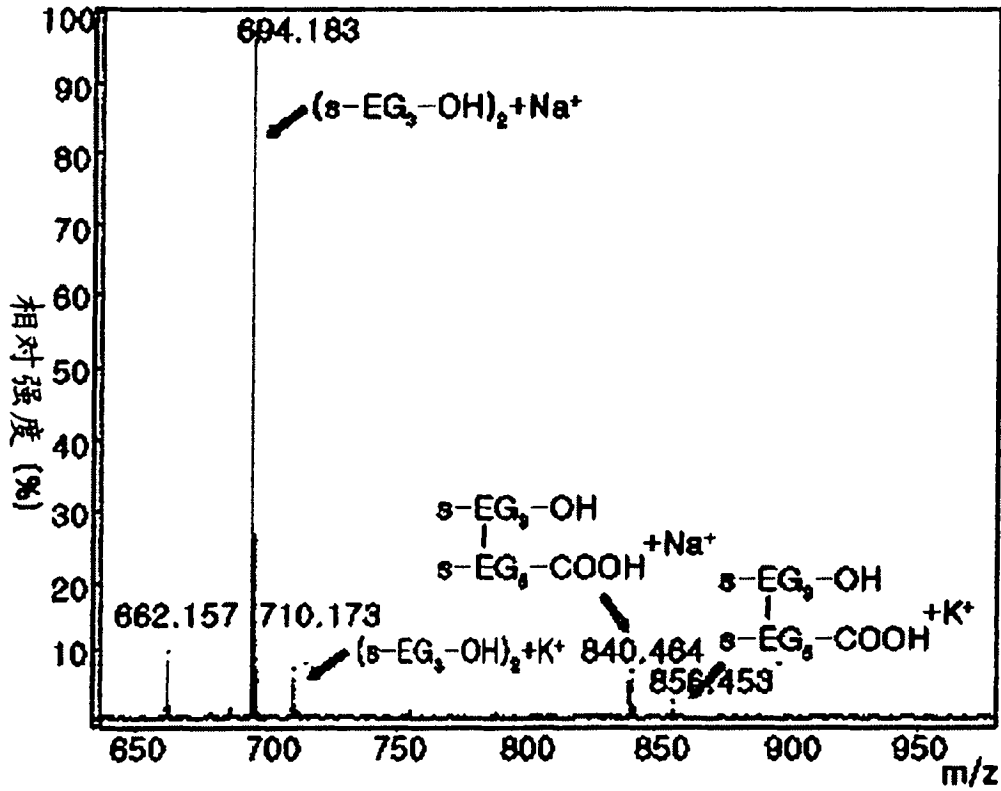


图 4

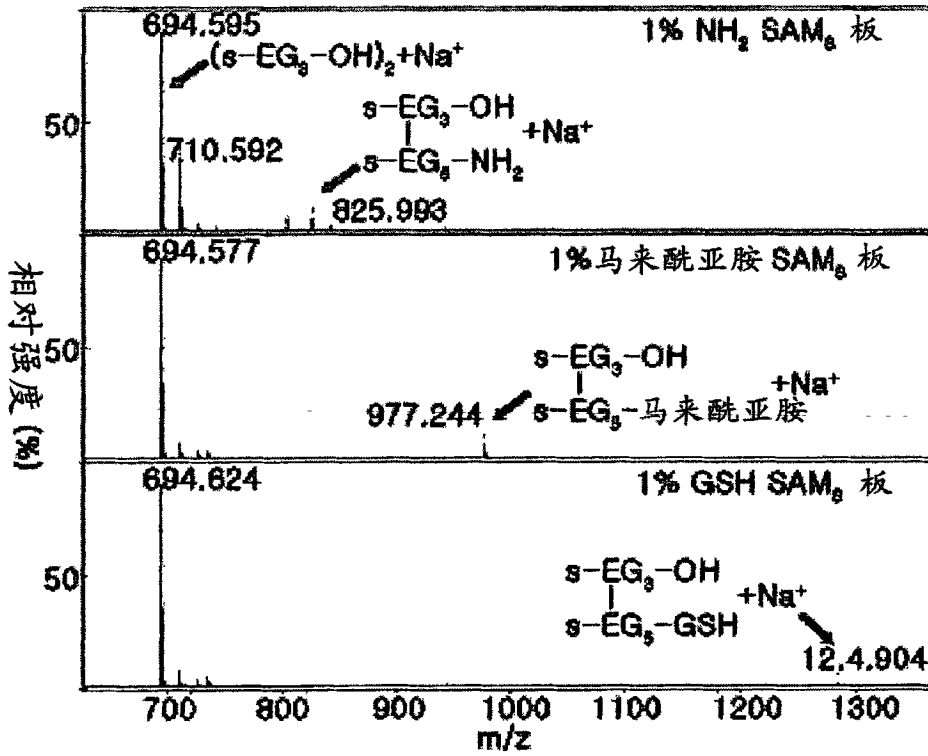


图 5

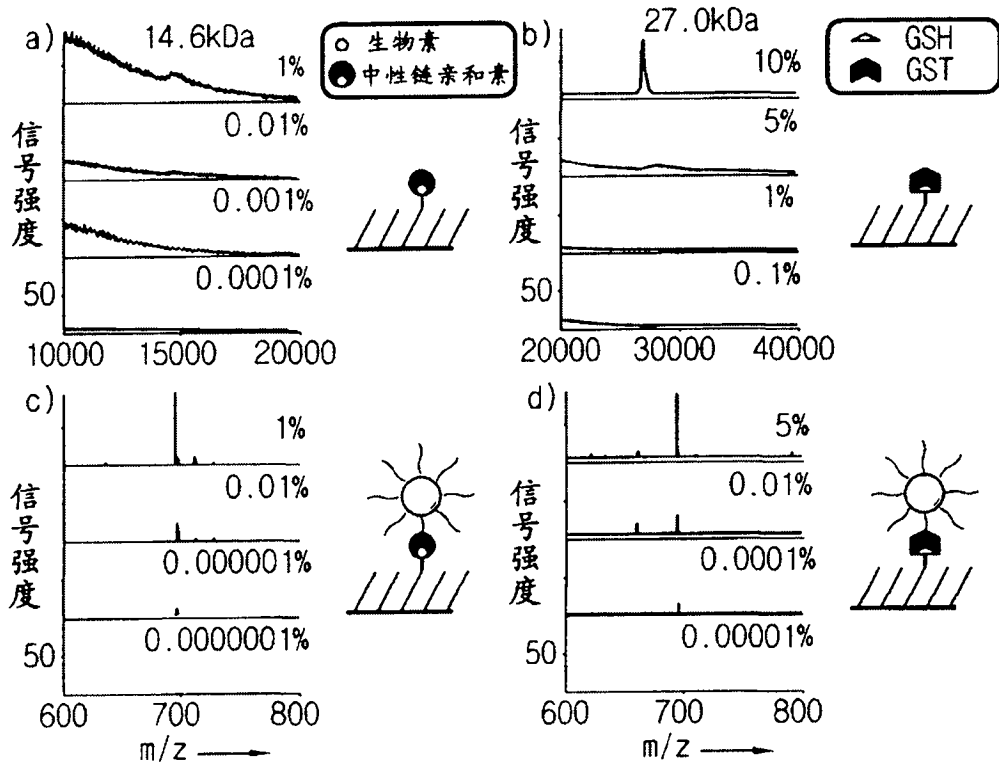


图 6

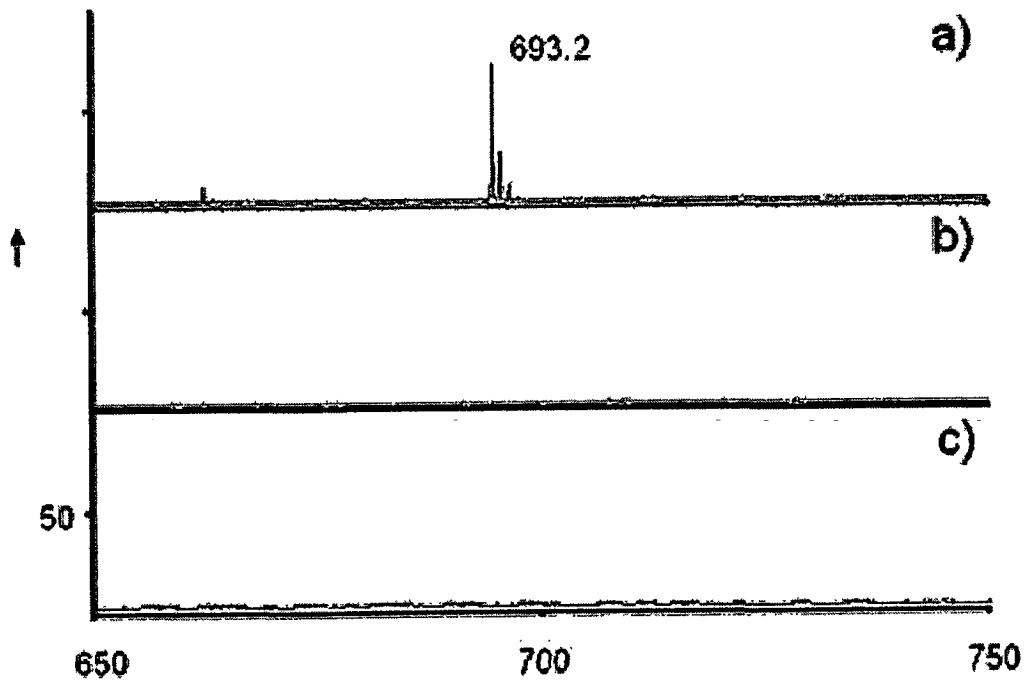


图 7

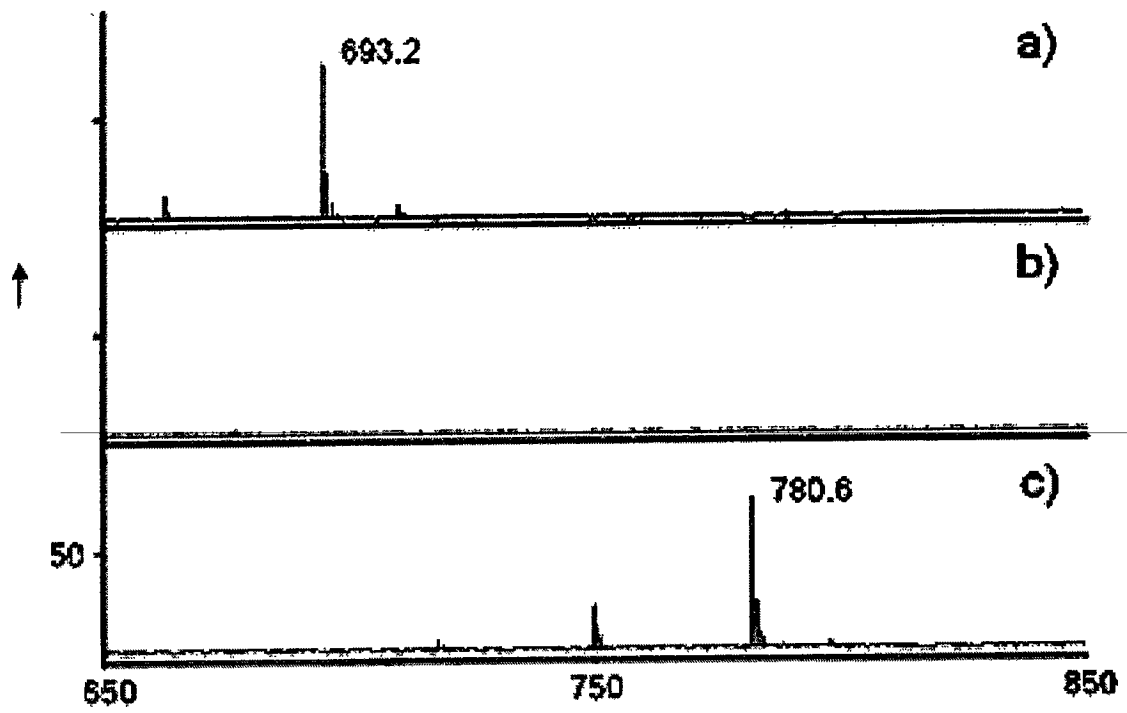


图 8

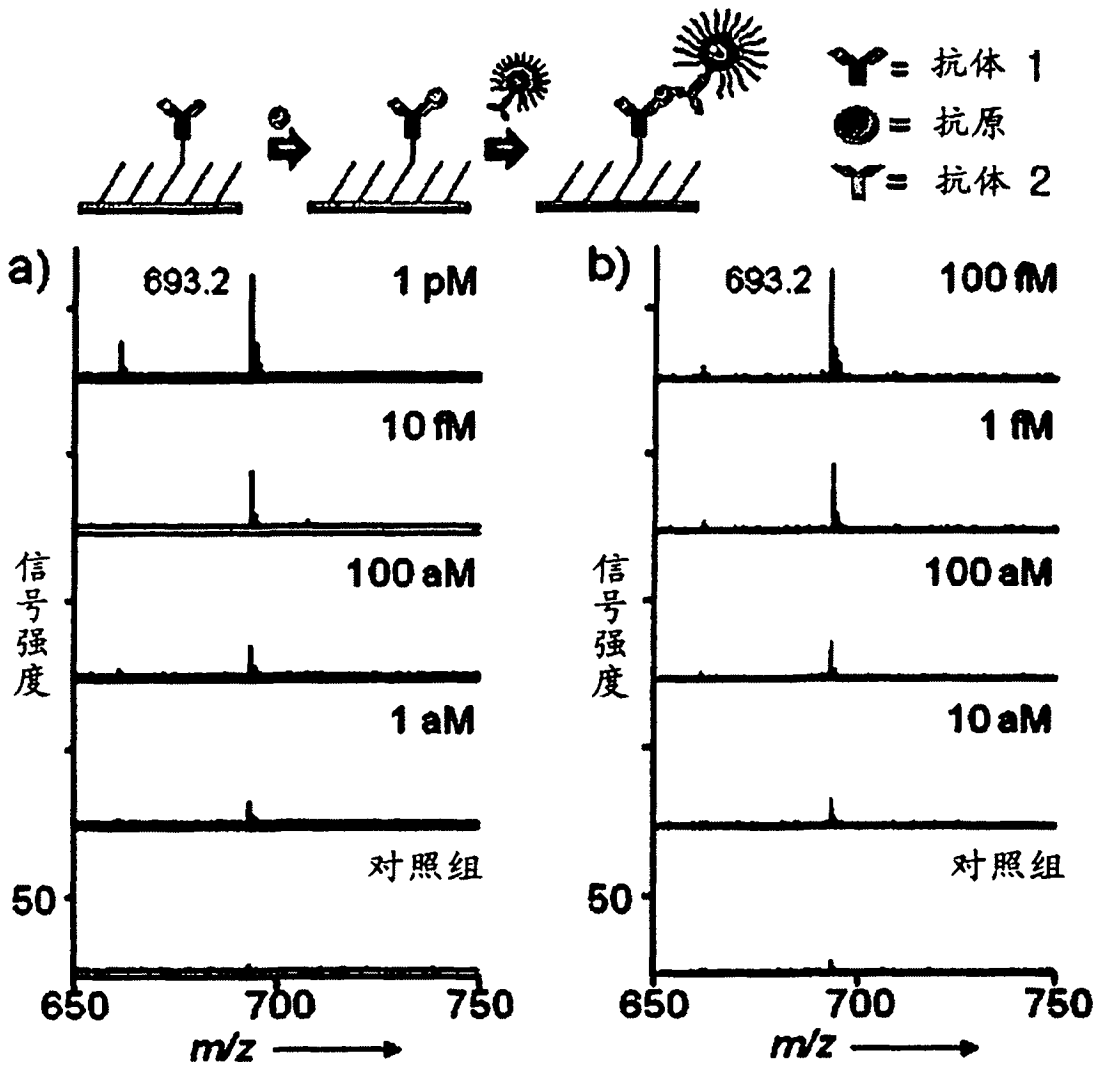


图 9