

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

H05H 3/04

G 01N30/00



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 02817929.3

[43] 公开日 2004年12月22日

[11] 公开号 CN 1557115A

[22] 申请日 2002.9.11 [21] 申请号 02817929.3

[30] 优先权

[32] 2001.9.13 [33] US [31] 09/951,117

[86] 国际申请 PCT/US2002/028819 2002.9.11

[87] 国际公布 WO2003/024163 英 2003.3.20

[85] 进入国家阶段日期 2004.3.12

[71] 申请人 芝加哥大学

地址 美国伊利诺斯州

[72] 发明人 戴维·G·格瑞尔

帕梅拉·T·库达

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利
商标事务所

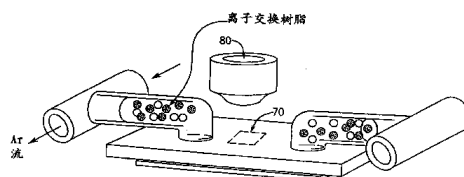
代理人 王永刚

权利要求书2页 说明书10页 附图10页

[54] 发明名称 由光学钳的静态阵列实现流动粒子
横向偏斜和分离的装置和方法

[57] 摘要

一种使用光学钳的静态阵列来横向偏斜和/或分离粒子流的方法和装置。在具有大于所关心粒子大小的格子常数的光学钳阵列中，由外力驱动通过阵列的粒子经受与捕获阵列的附加相互作用。通过改变捕获阵列相对于外力的角度，阵列内从捕获到捕获的粒子运动可以偏离于外力的方向，从而允许粒子的选择性偏斜和/或分离。



I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 一种用于粒子的受控偏斜的装置，包括：
多个粒子的一个源；
应用于多个粒子、来自一个源的外力；以及
相对于来自源的力的方向以倾斜角度定向的光学钳阵列。
2. 根据权利要求 1 的装置，其中倾斜角度被选择以最优化粒子的流动速度。
3. 根据权利要求 1 的装置，其中光学钳阵列包括多个光学势阱，每个具有势能深度并且布置成这样的模式，即用于建立相对于外力的选定的未对准的模式。
4. 根据权利要求 3 的装置，其中光学钳阵列包括对于多个光学钳的至少两个不同的势阱深度。
5. 根据权利要求 1 的装置，其中倾斜角度是可调节的，以选择粒子偏斜的方向。
6. 根据权利要求 5 的装置，其中偏斜的角度随着粒子的大小、粒子置于其中的介质的折射率、粒子的形状、粒子的密度和粒子的表面化学中的至少一个而变化。
7. 根据权利要求 1 的装置，其中外力被调节以修改粒子与外力方向的偏斜角度。
8. 根据权利要求 1 的装置，其中粒子运动的控制由对于光学钳具有变化的激光强度的激光束源来获得。
9. 根据权利要求 8 的装置，其中通过选择适当的激光强度，粒子中较大的一些可以优先地与粒子中较小的一些分离。
10. 根据权利要求 1 的装置，还包括光学钳阵列的附加级，以进一步偏斜粒子。
11. 根据权利要求 1 的装置，其中粒子选自胶体粒子，大分子，生物细胞，生物细胞器，染色体，及其混合物。
12. 一种控制粒子运动的方法，包括步骤：

提供粒子流;

将外力施加到粒子; 以及

形成相对于外力方向以角度倾斜的光学钳阵列。

13. 根据权利要求 12 的方法, 还包括改变用来形成光学钳阵列的激光束强度, 从而控制粒子的流动的步骤。

14. 根据权利要求 12 的方法, 还包括改变外力的强度, 从而控制粒子的流动的步骤。

15. 根据权利要求 12 的方法, 其中粒子具有大小, 形状, 密度, 电荷, 磁化率, 磁矩, 介电常数, 和非线性光学性质中至少一个的范围, 它们对于外力、激光束强度和光学钳阵列中至少一个具有可变的响应, 从而形成粒子的偏斜角度的范围。

16. 根据权利要求 12 的方法, 其中角度被调节, 以改变粒子的流动速度。

17. 根据权利要求 12 的方法, 其中偏斜连续地发生。

18. 根据权利要求 12 的方法, 其中激光被提供以形成光学钳阵列, 并且激光的波长被调节以控制粒子运动。

19. 根据权利要求 12 的方法, 其中当粒子流动时, 光学钳阵列、外力和倾斜角度中至少一个被动态地改变。

20. 根据权利要求 12 的方法, 其中粒子选自胶体粒子, 大分子, 生物细胞, 生物细胞器, 染色体, 以及它们的混合物。

由光学钳的静态阵列实现流动粒子 横向偏斜和分离的装置和方法

本发明的作出是在在美国政府的支持下由国家科学基金会授予的资助 No.DMR-9730189 下, 并且在资助 No.DMR-9880595 下通过国家科学基金会的 MRSEC 项目来进行的。政府在本发明中具有一定权利。

发明领域

本发明一般地涉及一种用于实现粒子分部分离 (fractionation) 的系统和方法。尤其, 本发明涉及一种通过使用光学捕获的静态阵列来实现粒子的横向分部分离和/或分离的系统和方法。

发明背景

能够在有限的环境中分部分离粒子的许多技术是常规已知的。例如, 一种这种技术涉及包括用于 DNA 分离的阻碍物或障碍物的二维格子 (lattice) 的微制造筛网的使用。阻碍物或障碍物的非对称配置整流通过筛网的 DNA 分子的布朗运动, 使得粒子能够沿着依赖于现存 DNA 的各自扩散系数的路径。虽然适度地有效, 但该技术包括许多限制。例如, 因为格子是微制造的, 整体结构既不能调谐也不能调节被分部分离的粒子的类型和大小。而且, 这种格子易于遭受堵塞, 需要系统的冲洗和重新启动。

此外, 用于分部分离粒子的许多常规技术沿着外加力的方向实现不同部分的物理分离。因此之故, 它们在样品的离散批上操作, 而不能连续地操作。

发明概述

因此,本发明的一个目的在于提供一种用于流动粒子的横向偏斜的改进系统和方法,其是可调谐且连续的。

本发明的另一个目的在于提供一种用于横向偏斜粒子的改进系统和方法,其不会变得容易被粒子堵塞。

本发明的再一个目的在于提供一种可用于粒子提纯和分离的改进系统和方法。

本发明的又一个目的在于提供一种用于横向偏斜粒子的改进系统,其可以用于蛋白质的提纯和分离。

本发明的另一个目的在于提供一种能够通过大小,形状,介电常数,表面电荷密度,磁化率,非线性光学性质,和折射率来物理地分离小粒子的改进系统。

本发明的又一个目的在于提供一种使用最小量的运动部件来横向偏斜流动粒子的改进系统和方法。

本发明的再一个目的在于提供一种用于横向偏斜粒子的改进系统和方法,其可用于染色体的分离。

本发明的又一个目的在于提供一种用于横向偏斜粒子的改进系统和方法,其可以用于DNA大小评估。

本发明的另一个目的在于提供一种用于横向偏斜粒子的改进系统和方法,其也可以用来提纯和/或分离大分子和/或纳米簇或者其他纳米大小的材料。

本发明的更多优点和特征将从下面说明本发明优选实施方案的说明书,权利要求书和附图中显然。

附图简述

图1A是将光学钳阵列投影到流动的胶体粒子悬浮体上的全息摄影光学钳系统的示意图;图1B是来自图1A的CCD照相机的示意视图;以及图1C是根据本发明用于横向偏斜流动粒子的 10×10 光学钳阵列的透视图表示;

图2A是显示通过对准的 10×10 光学钳阵列的粒子管道现象的绘

图；图 2B 是显示沿着相对于流向以五度的倾角定向的 10×10 光学捕获阵列的轴而流动的粒子的轨道的绘图；图 2C 是显示由相对于流向以三十七度的倾角定向的捕获阵列横向偏斜的粒子的轨道的绘图；以及图 2D 是显示流动通过相对于流向以四十五度的倾角定向的捕获阵列的粒子的基本上未偏斜轨道的绘图；

图 3 是通过与外力方向偏移倾角 θ 的光学捕获阵列的各个粒子的运动的第一表示；

图 4 是通过与外力方向偏移的光学捕获阵列的各个粒子的运动的第二表示；

图 5 是显示对于可比条件下的两个不同试验过程，粒子的横向速度与前向速度的比值相对于捕获阵列的角定向的绘图；以及

图 6 是与微流通道一起使用、用于粒子分离的光学钳静态阵列的表示。

发明详述

为了说明本发明的实施方案，提供说明以描述本发明一种实施方案的方法和功能。虽然描述现象的方式是为本领域技术人员说明本发明操作的一种严格的方法，也可以使用其他说明来描述表征本发明实施方案的类似结果。因此，本发明并不局限于通过下面的说明书和附图对其操作的描述。

为了全面地理解本发明，考虑如图 1A 中所示的全息摄影光学钳（optical tweezer）系统 10 和各个光学钳（optical tweezer）112 的由此得到的方阵列 110 是有帮助的。系统 10 包括通过衍射光学元件 30，然后由中继透镜 40 处理，由二向色镜 50 反射的激光束 20，然后激光束 20 由物镜 60 聚焦到光学捕获（optical traps）中。光学捕获（没有显示）在样品室 70 中形成，并且捕获的粒子阵列（没有显示）由包括聚光透镜 80，物镜 60，视频目镜 85 和电荷耦合器件照相机 90 的常规光显微系统来观察。

作为结果的光学钳系统 10 产生如图 1B 中所示的各个光学钳 112

的方阵列 110。光学钳 112 显示出格子常数，其典型地，虽然不是排它地，具有比所关心粒子 113 的大小稍微大的光学钳 112 之间的距离。由来自偏压源 117 的外力驱动通过阵列 110 的粒子 113 经历与各个捕获 112 的阵列 110 的附加相互作用。如果捕获力显著地大于外驱动力，粒子 113 将被束缚。另一方面，如果外力占优势，粒子 113 将流动通过阵列 110，它们的轨道基本上不受干扰。优选实施方案在中间状况中操作，其中对于样品中的所有粒子 113，外力都超过捕获力，但是对于样品的不同部分超出不同的程度。

在这些条件下，外力引起粒子 113 从捕获 112 的一个跳跃到另一个，偶尔依赖于光学捕获 112 和外力的相对强度中止一段时期，给定具体粒子 113 的性质。如果外力与捕获阵列 110 的主轴对准，由此得到的跳跃轨道将与外力对准。另一方面，如果捕获的轴相对于外力的方向旋转，那么粒子的跳跃可能偏离于外力的方向。这种偏斜已经在流动通过类型 II 超导体的磁通量子的计算机仿真中显示，并且已经直接从周期性约瑟夫逊结阵列中的横向电压梯度的外观推知。一旦阵列旋转到 45° ，净偏斜归零，出于两个原因之一（1）正和负的位移可以以等概率发生或者（2）粒子对角地跳跃通过阵列，已经变得锁定在 [11] 方向中。

图 3 和 4 是移动通过相对于外偏力 116 的方向具有倾角 θ 的捕获 112 的阵列 110 的各个粒子的图解或说明性一般表示（同样参看图 1C）。如图 3 和 4 中可以看到，依赖于阵列 110 的相对倾角 θ ，各个粒子 113 可能在正和负的方向上横向偏斜。

图 2A 显示使用系统 10 的实例，其具有 $1.5\mu\text{m}$ 直径二氧化硅的轨道 115，球形粒子 113 通过光学捕获或钳 112 的 10×10 阵列 110，每个钳 112 之间的间隔大约为 $2.4\mu\text{m}$ 。“y”轴代表大约 $53\mu\text{m}$ ，并且“x”轴代表大约 $78\mu\text{m}$ 。在该表示中，压力梯度正在以大约 $30\mu\text{m}/\text{sec}$ 的速度从左到右驱动粒子 113。使用阵列 110 的基本上零度倾角，粒子 113 锁定于具有最小横向偏斜的轨道中（从左到右）。图 2A-2D 中所示的测量的粒子轨道也被定向，使得外加的流从左到右定向。

因此,图 2A 显示大约 1000 球体(粒子 113)的轨道,流沿着[10]格子方向对准。粒子 113 从延伸至超过阵列边界大约 $3\mu\text{m}$ 的区域牵引到钳 112 的行中,此后沿着[10]行到达它们的端部。横向波动极大地由捕获势能所抑制,而粒子的纵向运动仅由各个光学势阱中的短暂不规则中止来不时地中断。粒子 113 进行横向跳跃所需的时间比纵向跳跃时间间隔大得多,以至于粒子 113 基本上决不离开[10]行。不连续的捕获势能对于粒子轨道的这种影响构成动力学地锁定状态。一旦粒子 113 已经跳跃通过钳 112 的等级,它们返回到总体流,它们的轨道最终通过扩散而彼此模糊不清。

通过角度 θ 旋转衍射光学元件 30 也旋转钳 112 相对于流向的模式,而其他方面不改变捕获的特性。图 2B 显示使用相对于流以 $\theta = 5^\circ$ 定位的光学钳 112 的同一样品。与图 2A 中一样,粒子的轨道保持紧密地锁定于阵列的[10]行中。但是,不同于图 2A 中的实例,轨道现在系统地偏斜远离流向。该偏斜在阵列的下游侧留下明显的阴影,比较少量的粒子 113 漂移到其中。

进一步的旋转显著地改变阵列的影响。图 2C 显示旋转到 $\theta = 37^\circ$ 的阵列,而其他条件未改变。不是沿着[10]格子行到达正的偏斜,粒子 113 现在已经锁定于[11]格子方向并且经历反向的偏斜。从[10]到[11]锁定状态的这种跨越反映出,当它沿着不同的方向受力时粒子 113 经历的不同局部势能场景(potential energy landscape)。在超过 22.5° 的几何确定的跨越点的某一阈角,[11]跳跃的跳跃率超出[10]跳跃的跳跃率足够大的裕度,以至于粒子 113 变得锁定于对角轨道中。如图 2D 中仍然进一步旋转到 $\theta = 45^\circ$ 减小偏斜的程度,而增加轨道与[11]格子方向的对准。

可以确信动力学锁定状态应当形成层次,其对于迁移性的影响应当随着增加旋转,采取纵向迁移中的台地中的 Devil 阶梯(Devil's staircase of plateau)的形式。我们对于锁定于[10]和[11]方向中的状态的观察对应于这些层次的主要台地(principal plateau)。

我们也观察横向偏斜随着单调增加的旋转角 θ 而改变的符号。这

不同于其他系统在于，没有任何符号变化预言随着增加的磁场，周期性调制的二维电子气的霍尔系数。如果确实这种符号翻转可能通过电子系统的简单图案形成来获得，效果将是有利的，并且可能在磁数据获取中具有广泛应用。

图 5, 数据点和连接实线代表当粒子 113 在系统 10 中经历的外加力和捕获力同等强时，由粒子 113 获得的相对横向速度。另一方面，虚线代表如果外加力 117 超过捕获力，对于同一粒子 113 所期望的横向偏斜的不存在。图 5 也显示，横向偏斜的量和方向可以通过对于给定的激光功率和外驱力 117 改变旋转角 θ 来优化。减小激光功率将减小可达到的最大偏斜，当激光 20 熄灭时没有偏斜发生（参看图 1A）。如图 5 中也可以看到，当倾角 θ 为 0° 或大约 22.5° 时，实际上根本不存在横向偏斜，对于大约 45° 的 θ 也应当不存在偏斜。但是，也应当指出，当倾角为大约 22.5° 时，也不存在横向偏斜。经验数据已经提出，对于给定的粒子大小和功率级，当倾角到达大约 17° 时，最大量的横向偏斜发生。当倾角通过大约 22.5° 时，粒子 113 的横向偏斜完全改变方向。经验数据已经提出，当倾角达到 30° 时，该正方向上的最大偏斜发生，虽然该最大偏斜基本上小于大约 17° 时发生的最大偏斜。横向偏斜对于方向的非单调依赖清楚地分析。中间和较小角度处的其他可能锁定方向可能难以在目前大小的系统中分析。原则上，通过光学钳 112 的较大阵列的迁移将揭示锁定状态的更大范围层次，可能类似于对于其他系统而预言的 Devil 阶梯（Devil's staircase）。

如在下文中提供的实例中更详细说明的，根据本发明的被动光学诱导横向偏斜已经在分散于去离子水(demonized water)中直径 $1.5\mu\text{m}$ 的硅胶球体的悬浮体中观察到。光学钳 112 的 10×10 阵列被创造，使得静态的计算机产生的衍射光栅由标准全息摄影光学钳（HOT）光学系统中波长为 532nm 的 73mW 的激光照射。粒子 113 包含在密封样品室 70 中的平行玻璃墙之间。流动因跨越样品室 70 的压差而诱导。跨越 $78\times 52\mu\text{m}^2$ 视场区域的粒子轨道在使用常规已知的图像分析技术数字化和分析之前记录在录像带上。

横向偏斜的粒子 113 可以由根据本发明的多种方法来收集。这些方法包括微流通道 (microfluidics channel) 的使用。没有被阵列偏斜的粒子 113, 可能因为它们相互作用因光学捕获而较弱或者因外力而较强, 将不会偏斜因此将不会被收集。该差别使得基于它们物理性质的最普遍考虑的粒子 113 的分部分离成为可能, 其中控制参数包括规模, 对称性, 范围, 和光学捕获阵列的强度, 以及外力的性质和强度。在图 2A-2D 中所示的实例中, 外力由流体动力阻力提供。此外, 粒子的分离可以基于对驱动力, 激光束强度, 和光学梯度条件的敏感度而实现, 其中粒子敏感变量是粒子大小, 粒子形状, 介电常数, 表面电荷密度, 磁化率, 非线性光学性质和折射率。

或者通过减小激光强度或者通过增加外驱动力来减小捕获效力使得否则被锁定的粒子 113 中的一些能够更容易地从钳 112 的一行跨越到下一行。这对于给定角度减小模式锁定度, 从而减小最大偏斜的角度以及最大偏斜自身, 直到最终没有剩余。该阈值应当独立于阵列的范围。

当去钉栓 (depinning) 时偏斜的损失也为非常通用的连续分部分离技术提供基础。受钳 112 的阵列影响较强的粒子 113 能够比受外力驱动较强的粒子 113 偏斜到更大的角度。例如, 对于仅半径 a 不同的粒子 113 考虑胶体球体。施加到次于波长大小的球体上的光学梯度力大约随着 a^3 而变化。另一方面, 众所周知的斯托克斯阻力随着“ a ”变化。因此, 具体化粒子 113 的较大球体受光学钳 112 不成比例地影响, 而较小的粒子 113 可以因较小的偏斜而通过。因此, 将光学钳 112 的阵列 110 接近最佳偏斜的角度而定向, 并且调节强度以使得最大的粒子 113 处于跳跃状态中, 使得该最大部分横向偏斜出否则形成的混流。偏斜的部分可以例如通过使得分离的部分流入各自的微流通道来连续地收集。未偏斜的部分可以由第一级下游的光学钳 112 的附加级来进一步分部分离。这些附加级甚至可以结合到具有分级特性的单个全息摄影光学钳阵列中。

连续的分部分离提供超过传统方法的明显好处, 传统方法例如凝

胶电泳，它沿着外加力线分离样品的各部分从而每次仅可以在离散量的材料上操作。

如在背景中描述的，不重合的力之间的竞争已经应用于其他连续分部分离方案，包括通过微加工的柱（**microfabricated post**）的阵列的电泳和通过由非对称的互成角度配置的电极而引起的介电泳布朗棘齿（**dielectrophoretic Brownian ratchet**）的流动。光学分部分离提供几个优点。光学钳 112 的阵列可以通过改变激光强度和阵列方向来动态地重新配置。甚至格子常数和对称性可以被调节以适合所探讨的分部分离问题。不同于对所有粒子 113 代表固定障碍物的柱（**post**），光学钳 112 可以对不同的材料具有明显不同的影响。因此波长的选择开辟连续光学分部分离的另外可能性。此外，所有这些性能确定的性质可以在操作过程中连续地改变。常见的失效方式例如堵塞类似地可以通过熄灭捕获阵列来补救。而且，不同于基于微制造样品室的系统，光学分部分离需要非常简单的样品处理，所有分类通过光的图案而不是通过物质的分布来完成。由光学梯度调停的分子漂移的近期观察使得可以断定，基于通过光学钳 112 的阵列 110 的迁移的分部分离甚至可以应用于低至大分子的规模。在这里描述的被动光学诱导横向偏斜的实现中力的直接考虑证明高度选择的分部分离的能力。

上述原理可以用作一种将粒子 113 分离成两个不同流动的方法。图 6 显示分支成第一子通道 122 和第二子通道 124 的微流通道 120 的实例。在微流通道 120 划分成第一和第二子通道 122 和 124 之前，光学钳 128 的阵列 126 由于外力相对于流 u 有角度地偏移。在较大粒子 130 和较小粒子 132 都通过阵列 126 的情况下，较大粒子 130 因粒子的较大半径而引起比较小粒子 132 更多的横向偏斜。作为该动作的结果，较小粒子 132 将在基本上直线中移动至第二子通道 124 中，而较大粒子 130 将移动至部分偏移的第一子通道 122 中。

因此，本发明的方法可以在许多应用中使用。这些应用包括但不限于染色体的分离、粒子类型和蛋白质的提纯、以及 DNA 大小评估。另外，大分子和纳米簇可以以类似的方式来操作。此外，也能够彼此

串联地合并钳 112 的许多有角度偏移的阵列。这种配置允许粒子 113 的进一步分离。

下面的非限制性实例说明本发明的一般确定的原理。

实例

图 1 中示意显示的一种优选系统包括分散于去离子水中并且限于平行玻璃表面之间的水平层 $15\mu\text{m}$ 厚的 $1.5\mu\text{m}$ 直径二氧化硅球体 (Bangs Labs)。这些球体显著地比水稠密, 并且容易沉积到样品室底壁上大约 $2\mu\text{m}$ 的单层中。样品容积的边缘被密封以形成流道。通过上玻璃墙接合到孔的两个玻璃管提供了到样品容积的通路并且用作胶体、水和清洁的混合床离子交换树脂的储存器。管的端部连接到湿润的 Ar 气体的连续流。阻挡各个流中的一个引起压力不平衡, 其驱动胶体通过样品室和通过安装在 Olympus IMT-2 显微镜座上的 $100\times\text{NA } 1.4$ 油浸物镜的 $75\times 58\mu\text{m}^2$ 视场区域。通过控制 Ar 流, 我们可以诱导胶体以高达 $100\mu\text{m}/\text{sec}$ 在一个小时或更长时期中移动。

各个球体的面内运动使用精密数字视频显微镜以 $1/60\text{sec}$ 间隔 10nm 的分辨率来跟踪。由此得到的轨道数据使得我们能够监控球体通过我们用光创造的势能场景 (potential energy landscape) 的前进。

我们的光学势能场景基于全息摄影光学钳技术, 其中单束光使用计算机产生的衍射光束分离器形成光学捕获的任意配置。由该衍射光学元件 (DOE) 创造的每个光束由物镜聚焦到能够稳定地捕获二氧化硅球体中的一个的衍射限制光点中。虽然全息摄影光学钳可以以三维任意排列, 我们选择具有 $2.4\mu\text{m}$ 格子常数的平面 10×10 方阵列, 来模拟典型地在类似物理系统的理论和数值处理中讨论的自由能调制。捕获聚焦到单层的平面中, 以避免当它们流过时垂直地移位球体。

如果因流动的流体而导致的斯托克斯阻力极大地超过光学钳的最大捕获力, 那么胶体粒子流动通过阵列且它们的轨道不受干扰。相反, 如果捕获力占优势, 那么粒子不可逆转地落入它们遇到的第一捕获中。我们的观察在捕获和粘滞力几乎匹配的中间条件下执行。在这些条件下, 捕获阵列对粒子轨道的影响依赖于它相对于流的方向。在

捕获力超过粘滞力的对称阻碍的方向上，流仍然可以将粒子推动足够远到达各个捕获的边缘以至于可以热辅助跳跃到下一个阱。对称有利方向上的低势能障碍物仅可以调制通过粒子的速度。在这些环境下从阱跳跃到阱的粒子基于几何接近性和有效适宜性之间的折衷选择通过势能场景的路径。这些折衷导致当驱动力与捕获势能的关系变化时感兴趣的动力学转变。

我们的二氧化硅球体进入 $30 \pm 3 \mu\text{m}/\text{sec}$ 的流动速度和 $100 \pm 10 \mu\text{W}$ 捕获的激光强度的跳跃状态。单层 (minelayer) 中球体的真实密度足够低以至于至多 5% 的捕获在任何时间被占据。虽然碰撞有时在跳跃粒子之间发生，它们比较罕见。图 2A-2D 中所示的数据以这种方式获得。

虽然本发明的优选实施方案已经显示和描述，本领域技术人员应当清楚，可以不背离其更广泛方面的本发明而做各种改变和修改。

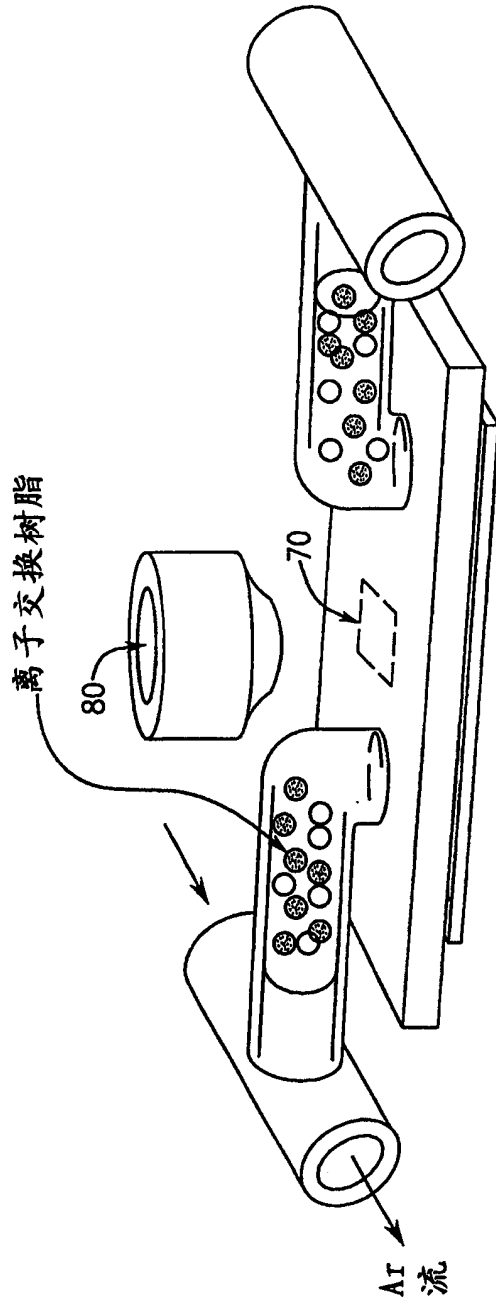


图1A

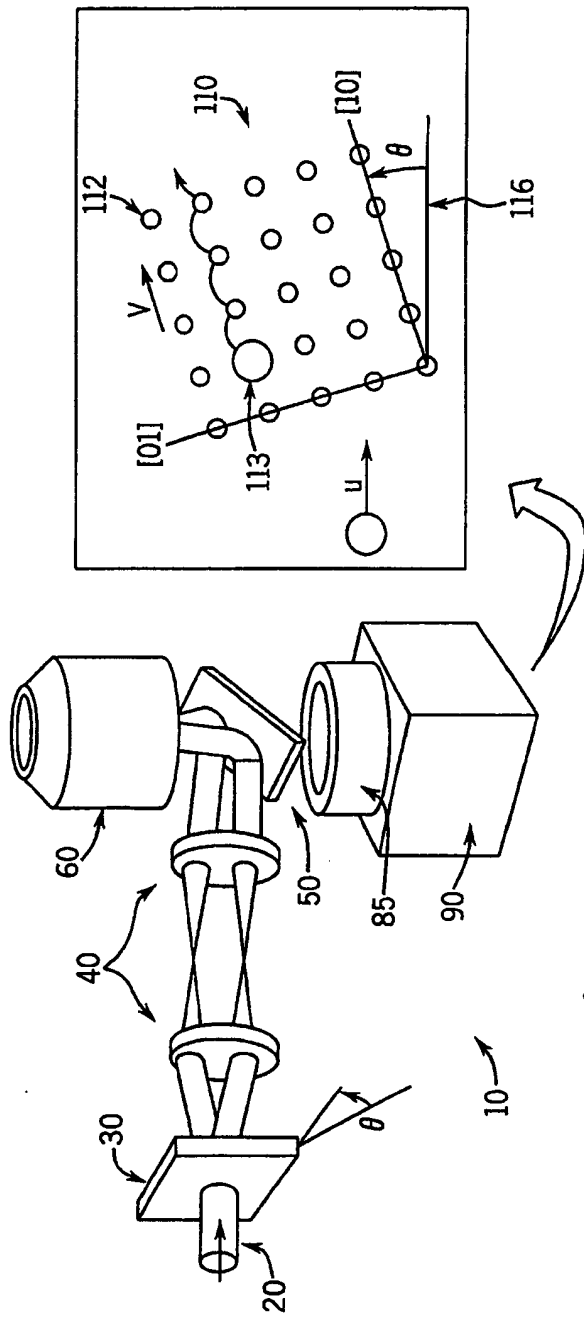


图 1B

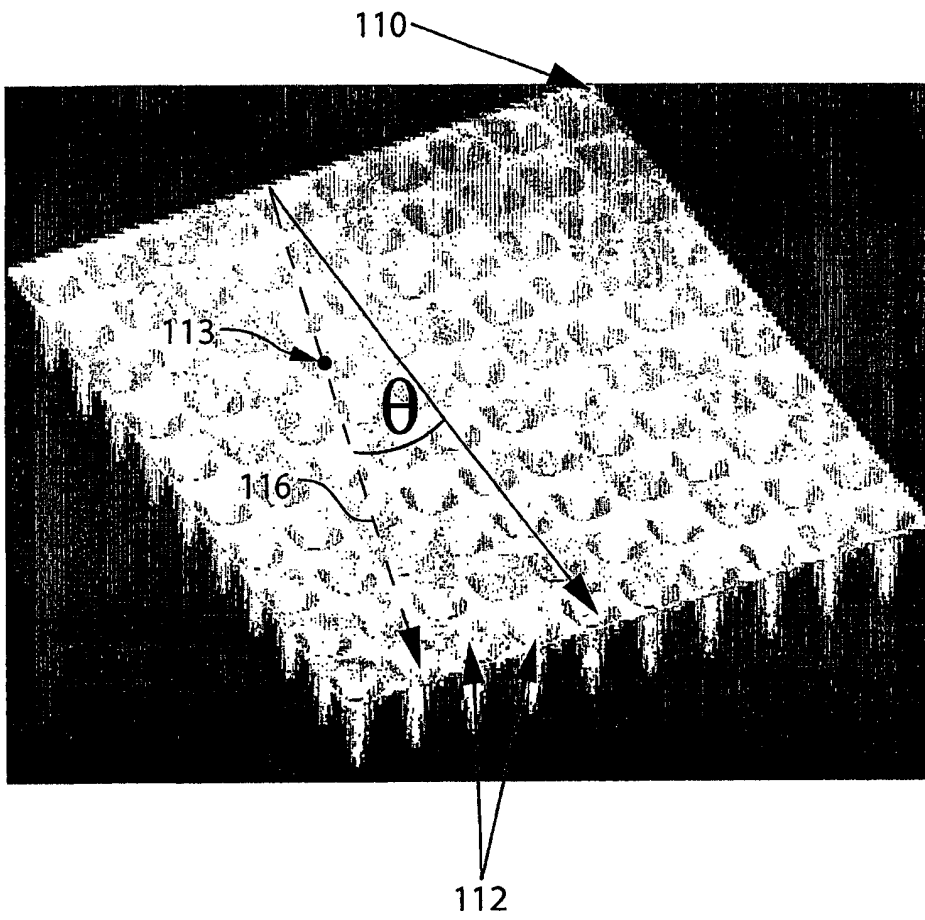


图1C

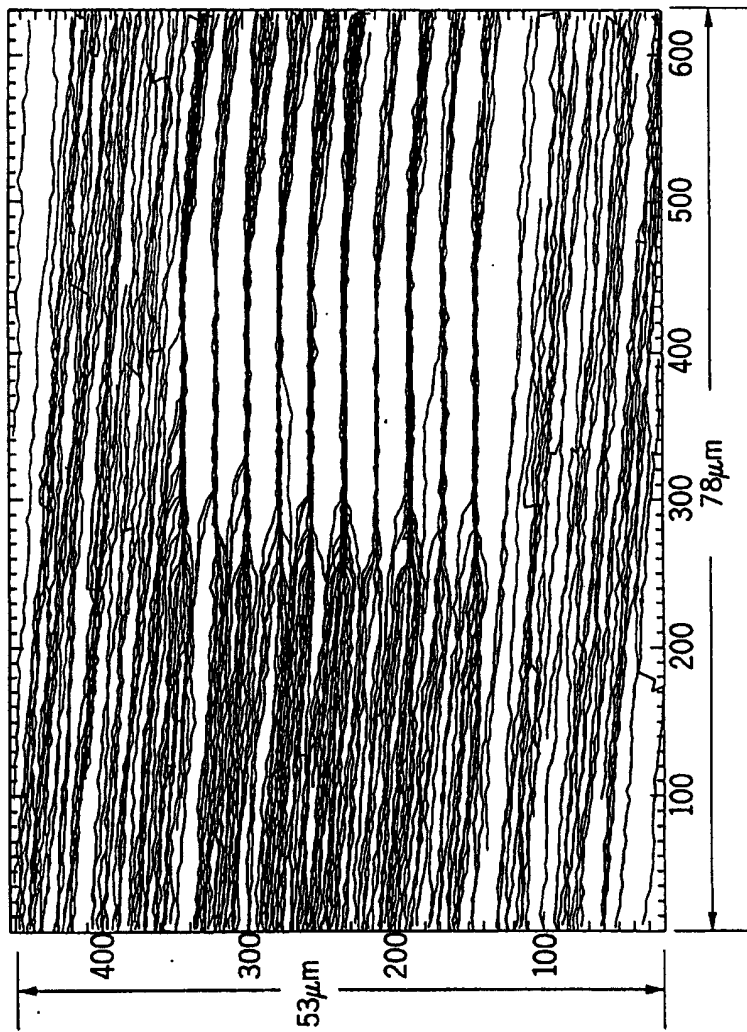


图 2A

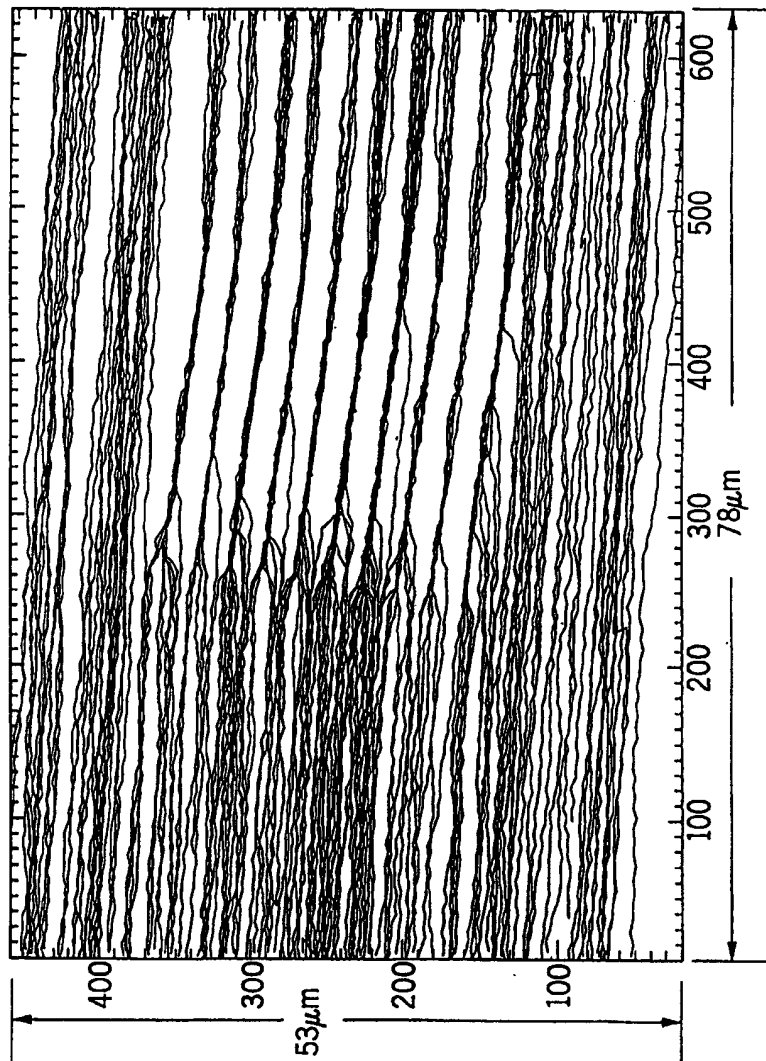


图 2B

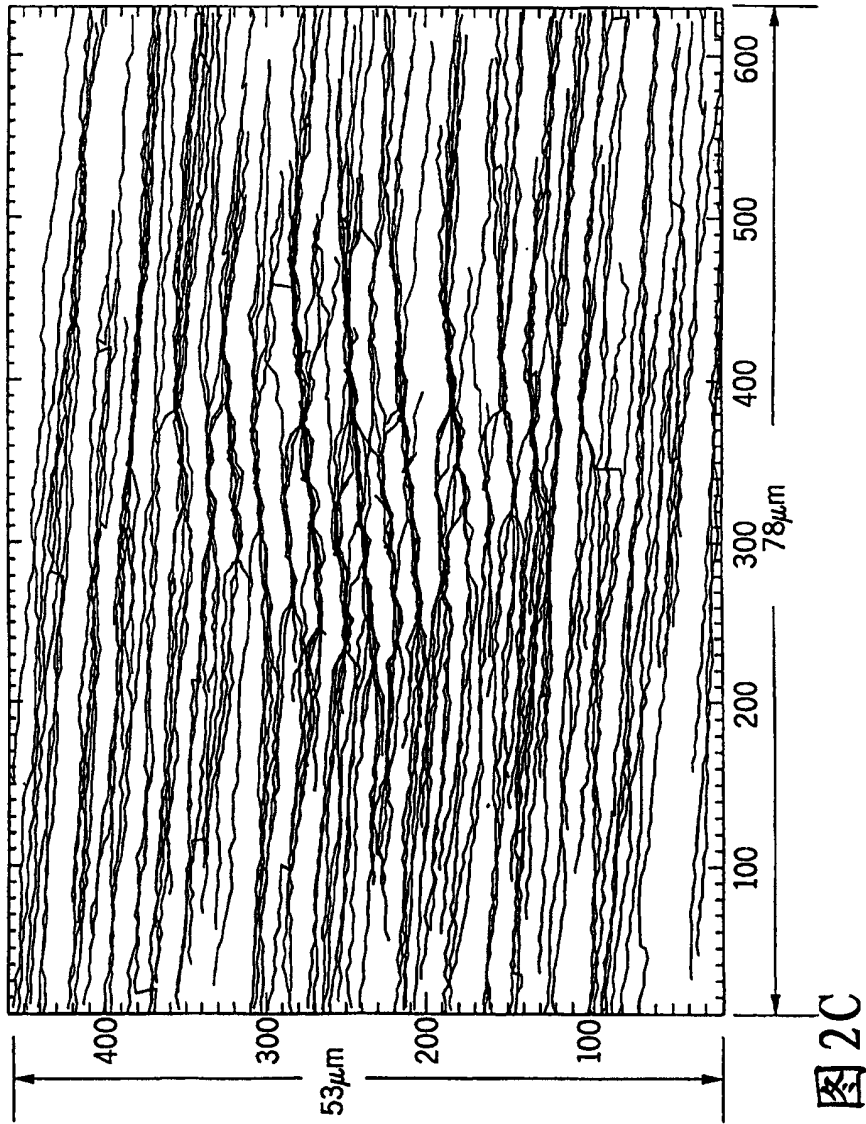


图 2C

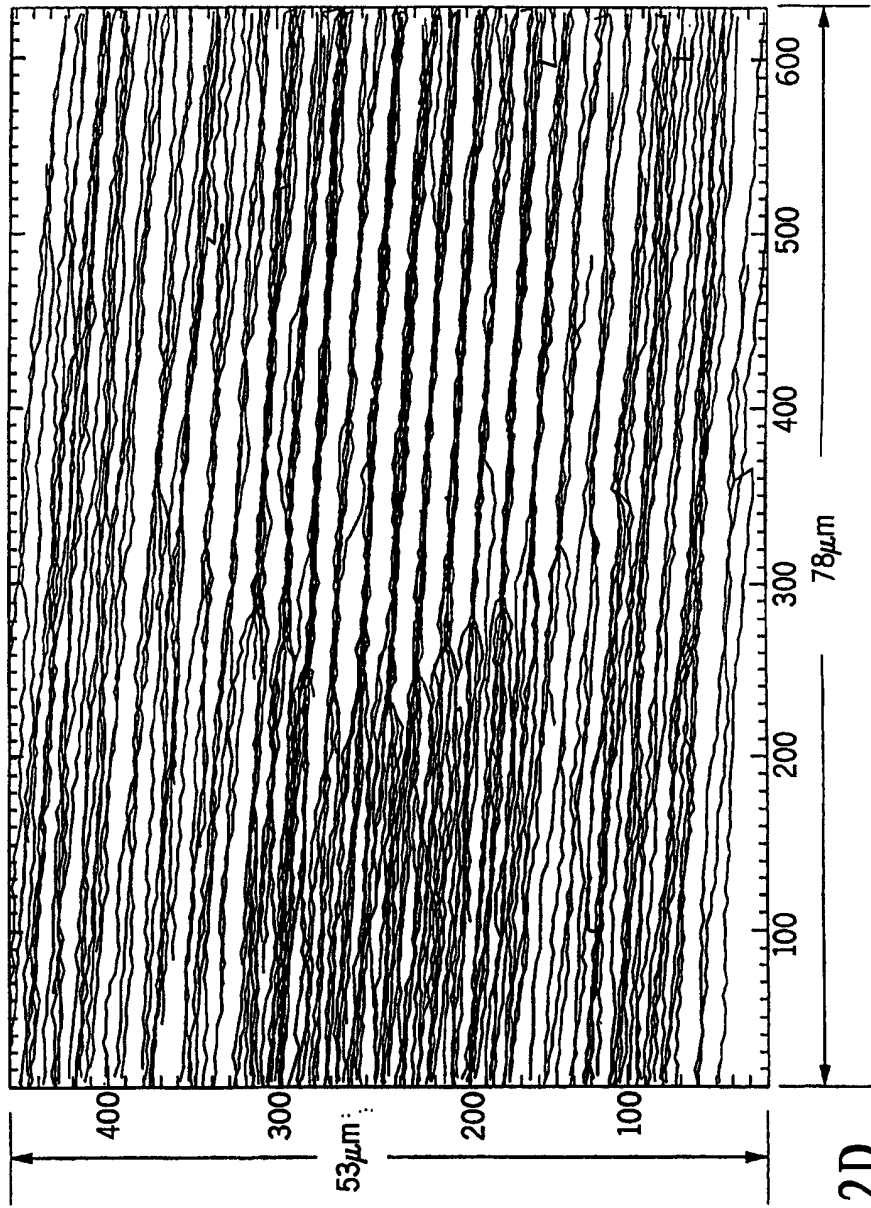


图 2D

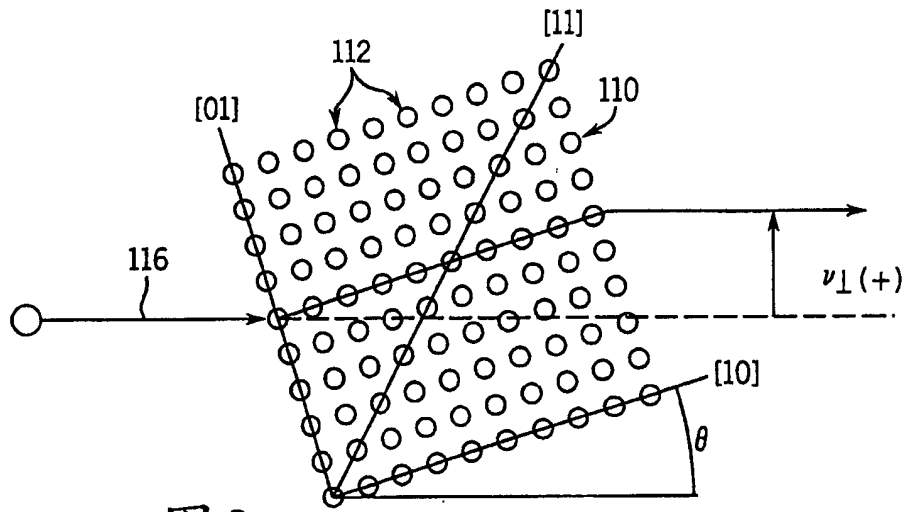


图 3

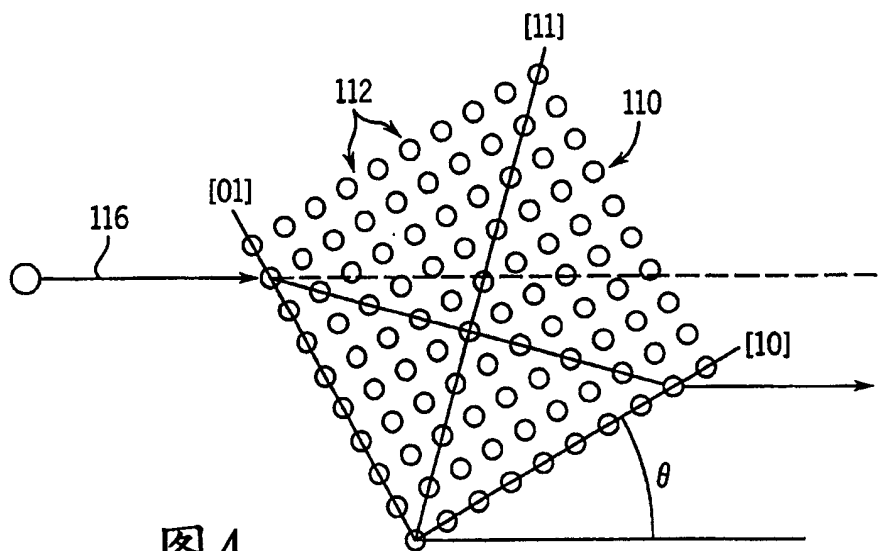


图 4

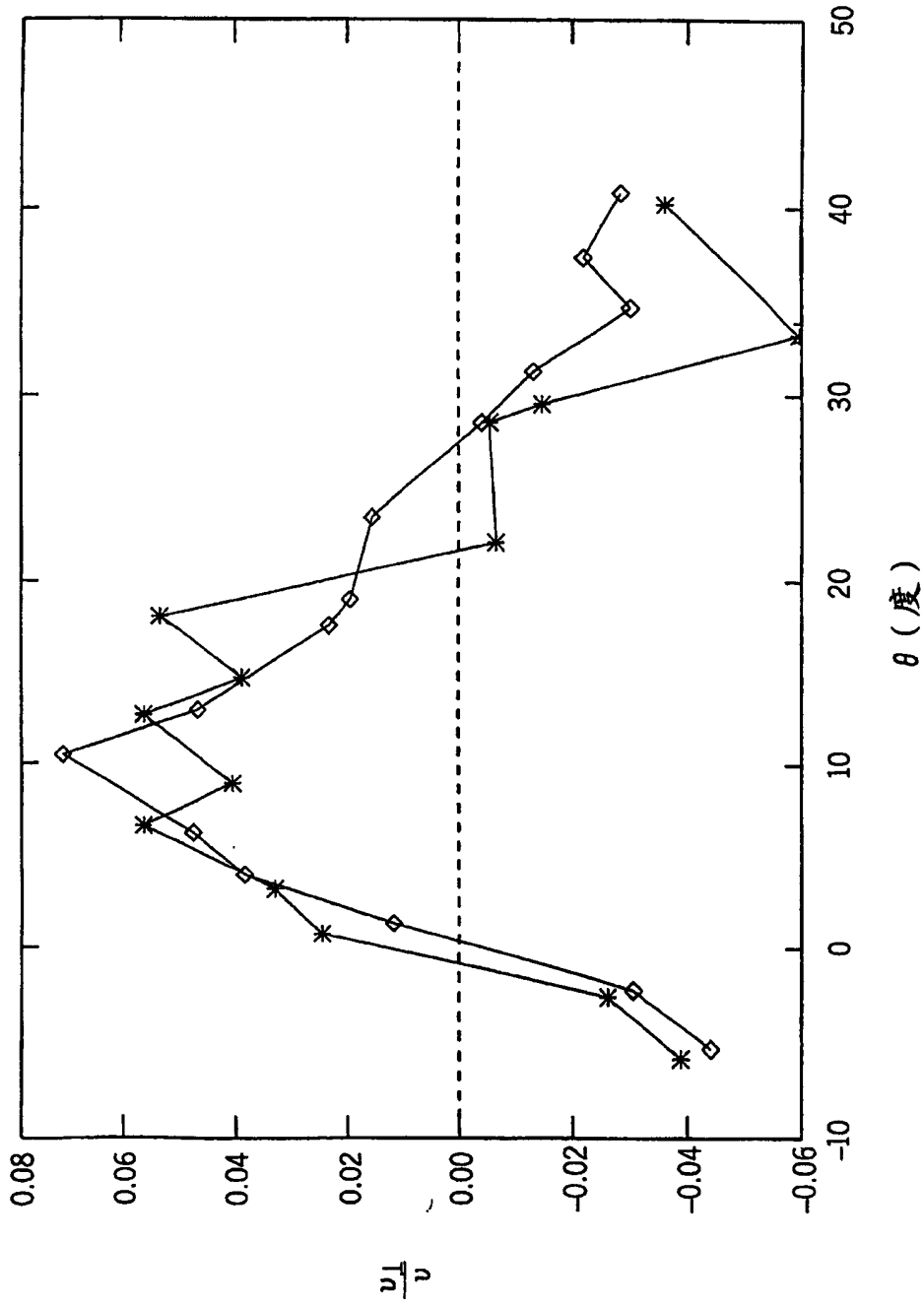


图5

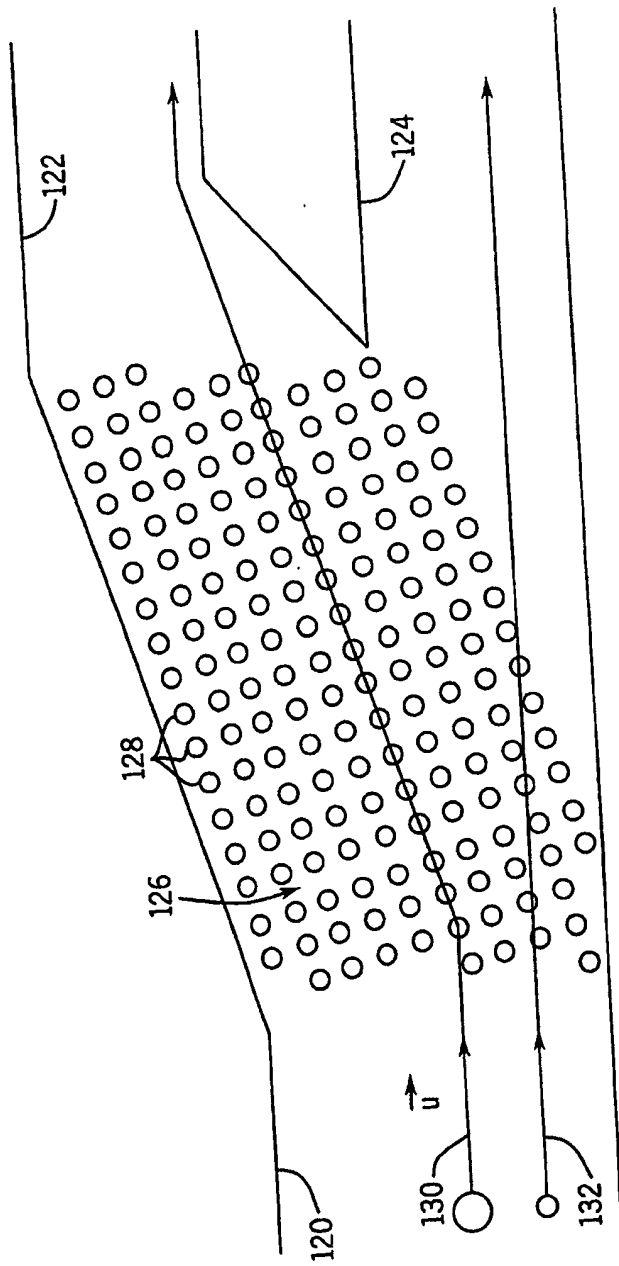


图6