



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111721595 A

(43)申请公布日 2020.09.29

(21)申请号 202010195797.0

(22)申请日 2020.03.18

(30)优先权数据

2019-053592 2019.03.20 JP

2019-232592 2019.12.24 JP

(71)申请人 株式会社理光

地址 日本东京

(72)发明人 植松克之 铃木一己

(74)专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司 11245

代理人 魏延玲

(51)Int.Cl.

G01N 1/28(2006.01)

G01N 1/42(2006.01)

G01N 27/62(2006.01)

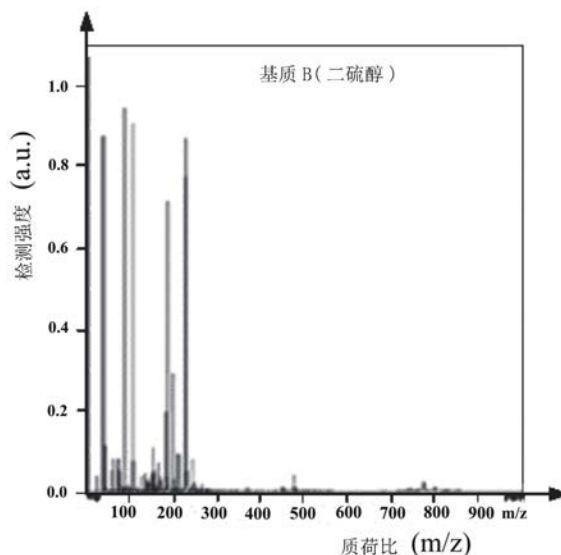
权利要求书1页 说明书14页 附图18页

(54)发明名称

MALDI质谱分析用测定试样制备方法及其装置

(57)摘要

本发明涉及MALDI质谱分析用测定试样制备方法, MALDI质谱分析用测定试样制备装置, MALDI质谱分析用测定试样, MALDI质谱分析方法, 以及计算机可读存储介质。本发明的课题在于, 提供通过MALDI进行质谱分析时可向一个试样配置二种以上基质的MALDI质谱分析用测定试样制备方法。在本发明的MALDI质谱分析用测定试样制备方法中, 基材将用于制备MALDI质谱分析用测定试样的基质配置在表面, 通过将激光束照射所述基材的与配置所述基质侧相反侧的所述基材的表面, 使得所述基质从所述基材飞行, 使其配置在MALDI质谱分析对象的试样的规定位置。



1. 一种MALDI质谱分析用测定试样制备方法,其特征在于:

基材将基质配置在表面,通过将激光束照射所述基材的与配置所述基质侧相反侧的所述基材的表面,使得所述基质从所述基材飞行,使其配置在MALDI质谱分析对象的试样的规定位置。

2. 如权利要求1所述的MALDI质谱分析用测定试样制备方法,其特征在于:

从所述基材飞行的所述基质为二种以上。

3. 如权利要求2所述的MALDI质谱分析用测定试样制备方法,其特征在于:

使得从所述基材飞行的二种以上的所述基质配置在所述MALDI质谱分析对象试样的互不相同的规定位置。

4. 如权利要求1~3任一个所述的MALDI质谱分析用测定试样制备方法,其特征在于:

配置为相对所述MALDI质谱分析对象试样的规定位置,使得所述基质从所述基材多次飞行。

5. 如权利要求1~4任一个所述的MALDI质谱分析用测定试样制备方法,其特征在于:

所述激光束为光学涡旋激光束。

6. 如权利要求1~5任一个所述的MALDI质谱分析用测定试样制备方法,其特征在于:

所述激光束的照射直径为5 μm 以上、100 μm 以下。

7. 如权利要求1~6任一个所述的MALDI质谱分析用测定试样制备方法,其特征在于:

配置在所述基材表面的所述基质为层状及点状的至少某个。

8. 一种MALDI质谱分析用测定试样制备装置,其特征在于,包括照射机构,该照射机构基于权利要求1~7任一个所述的MALDI质谱分析用测定试样制备方法,将激光束照射所述基材表面。

9. 一种MALDI质谱分析用测定试样,其特征在于,包括:

MALDI质谱分析对象的试样;以及

在所述试样上配置在所述规定位置的二种以上的基质。

10. 一种MALDI质谱分析方法,其特征在于:

使用权利要求9所述的MALDI质谱分析用测定试样进行MALDI质谱分析。

11. 一种计算机可读的记录介质,其特征在于,其中存储MALDI质谱分析用测定试样制备程序,该程序通过处理器执行,实现以下处理:

根据MALDI质谱分析对象试样的位置信息,基材将基质配置在表面,通过将激光束照射所述基材的与配置所述基质侧相反侧的所述基材的表面,使得所述基质从所述基材飞行,使其配置在MALDI质谱分析对象的试样的规定位置。

MALDI 质谱分析用测定试样制备方法及其装置

技术领域

[0001] 本发明涉及MALDI质谱分析用测定试样制备方法, MALDI质谱分析用测定试样制备装置, MALDI质谱分析用测定试样, MALDI质谱分析方法, 以及计算机可读存储介质。

背景技术

[0002] 质谱分析(mass spectrometry)是一种分析方法, 其使含有对象分子的试样离子化, 由质荷比(质量-电荷比) (m/z) 分离检测对象分子由来的离子, 能够获取对象分子中的关于特定化学结构的信息。

[0003] 在质谱分析中, 试样的离子化是影响分析质量的因素, 一直以来已开发出多种方法。例如, 可以列举MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization, 基质辅助激光解吸/电离) 和ESI (Electro Spray Ionization, 电喷雾离子化) 等。这些方法即使在试样量为微量也容易离子化, 因此, 用于生物和医疗等技术领域。

[0004] 在MALDI中, 基质(matrix) 作为用于辅助试样离子化的物质, 通过向将基质赋予试样的地方处照射脉冲激光, 与基质一起使试样离子化。

[0005] 作为脉冲激光, 大多使用紫外区域的波长, 优选根据基质的光吸收特性的波长。另外, 基质是结晶性的有机低分子, 据说必须作为与试样的共结晶或混合物。由于认为该共晶的均一度和混合程度会影响分析的灵敏度和精度, 因此, 开发适用于试样的基质。

[0006] 还提出关于将这些基质赋予试样的各种方法。例如, 提出以下质谱分析用试样制备方法: 将基质蒸镀形成微结晶, 接着, 将基质溶液喷雾, 在微结晶上使得基质结晶生长(例如, 参照专利文献1)。

[0007] 【专利文献】

[0008] 【专利文献1】日本特开2014-206389号公报

发明内容

[0009] 本发明就是鉴于上述以往技术所存在的问题而提出来的, 其目的在于, 提供通过MALDI进行质谱分析时可向一个试样配置二种以上基质的MALDI质谱分析用测定试样制备方法。

[0010] 作为用于解决上述课题的手段, 本发明的MALDI质谱分析用测定试样制备方法, 其特征在于:

[0011] 基材将用于制备MALDI质谱分析用测定试样的基质配置在表面, 通过将激光束照射所述基材的与配置所述基质侧相反侧的所述基材的表面, 使得所述基质从所述基材飞行(fly), 使其配置在MALDI质谱分析对象的试样的规定位置。

[0012] 下面说明本发明效果:

[0013] 根据本发明, 可以提供通过MALDI进行质谱分析时可向一个试样配置二种以上基质的MALDI质谱分析用测定试样制备方法。

附图说明

- [0014] 图1A是表示粉体形成装置的整体一例的概略图。
- [0015] 图1B是表示图1A的液滴形成单元中的液滴形成头的概略图。
- [0016] 图1C是图1A的液滴形成单元的A-A'线截面图。
- [0017] 图2是表示能在本发明的MALDI质谱分析用测定试样制备方法中使用的激光束照射手段一例的概略图。
- [0018] 图3A是表示MALDI质谱分析用测定试样制备装置的硬件一例的方框图。
- [0019] 图3B是表示MALDI质谱分析用测定试样制备装置的功能一例的方框图。
- [0020] 图3C是表示本发明的MALDI质谱分析用测定试样制备程序的处理步骤一例的流程图。
- [0021] 图4A是表示实施例的基质板A的照片。
- [0022] 图4B是表示实施例的基质板B的照片。
- [0023] 图5是在实施例中将试样切片载置在ITO镀膜载波片上时的照片。
- [0024] 图6A是表示实施例的MALDI质谱分析用测定试样的制备的概略图。
- [0025] 图6B是表示实施例的MALDI质谱分析用测定试样的制备的概略图。
- [0026] 图7A是表示作为实施例的MALDI质谱分析结果使用基质A时的频谱的图线。
- [0027] 图7B是表示作为实施例的MALDI质谱分析结果使用基质B时的频谱的图线。
- [0028] 图8A是表示作为参考例的MALDI质谱分析结果使用基质A时的频谱的图线。
- [0029] 图8B是表示作为参考例的MALDI质谱分析结果使用基质B时的频谱的图线。
- [0030] 图9A是表示一般激光束的波面(等位相面)一例的概略图。
- [0031] 图9B是表示一般激光束的光强度分布一例的图。
- [0032] 图9C是表示一般激光束的位相分布一例的图。
- [0033] 图10A是表示光学涡旋激光束的波面(等位相面)一例的概略图。
- [0034] 图10B是表示光学涡旋激光束的光强度分布一例的图。
- [0035] 图10C是表示光学涡旋激光束的位相分布一例的图。
- [0036] 图11A是表示使得一般激光束照射光吸收材料时一例的照片。
- [0037] 图11B是表示使得光学涡旋激光束照射光吸收材料时一例的照片。
- [0038] 图12A是表示光学涡旋激光束的干扰检测结果一例的说明图。
- [0039] 图12B是表示中心具有光强度0的点的激光束的干扰检测结果一例的说明图。
- [0040] 图13A是表示实施例1及2的MALDI质谱分析用测定试样的制备方法的概念图。
- [0041] 图13B是表示使用实施例1的MALDI质谱分析用测定试样的制备方法的结果的光学显微镜照片的二值化图像一例的图。
- [0042] 图14A是表示实施例3的MALDI质谱分析用测定试样的制备方法的概念图。
- [0043] 图14B是表示使用实施例3的用高斯激光束的MALDI质谱分析用测定试样的制备方法的结果的光学显微镜照片的二值化图像一例的图。
- [0044] 图15A是表示使用光学涡旋激光束转印的试样的显微镜图像一例的图。
- [0045] 图15B是表示使用高斯激光束转印的试样的显微镜图像一例的图。
- [0046] 具体实施形态
- [0047] (MALDI质谱分析用测定试样制备方法以及MALDI质谱分析用测定试样制备装置)

[0048] 所谓MALDI是“Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization(基质辅助激光解吸/电离)”的缩略,是称为基质支援激光脱离离子化法的质谱分析的一种方法。

[0049] 在使用该MALDI的质谱分析(以下称为“MALDI质谱分析”)中,基质作为用于辅助离子化的材料,通过向将基质赋予试样的地方照射脉冲激光,与基质一起使试样离子化,进行质谱分析。

[0050] 该基质根据试样中想要分析的成分分别使用。

[0051] 本发明的MALDI质谱分析用测定试样制备方法以及MALDI质谱分析用测定试样制备装置是基于在向试样喷射基质进行涂布的方法、用气相喷雾或蒸镀进行涂布的方法等以往的方法中,对一个试样只能配置一种基质的见解。换言之,基于以下见解:根据想要分析的成分,存在最佳的基质,但是,在以往方法中,即使有多个想要分析的成分,在一个试样中,不能分开涂布最佳基质。

[0052] 本发明的MALDI质谱分析用测定试样制备方法基于以下见解:在以往的方法中,大多依赖于操作者的技术,因此,基质的结晶直径易成为不均匀,定量性低,因此,有时对分析的灵敏度和精度产生影响。

[0053] 在本发明的MALDI质谱分析用测定试样制备方法中,基材将用于MALDI质谱分析用测定试样制备的基质配置在表面,通过将激光束照射所述基材的与配置所述基质侧相反侧的所述基材的表面,使得基质从所述基材飞行,使其配置在MALDI质谱分析对象的试样的规定位置。

[0054] 本发明的MALDI质谱分析用测定试样制备装置是在MALDI质谱分析用测定试样制备方法中使用的MALDI质谱分析用测定试样制备装置,包括对基材表面照射激光束的照射手段,根据需要,进一步包括其它手段。

[0055] 由此,本发明的MALDI质谱分析用测定试样制备方法即使只有一个试样,也可以将例如蛋白质、脂质、核苷酸等的适合于想分析目标的基质配置在各自的规定位置。因此,本发明的MALDI质谱分析用测定试样制备方法即使对于一个试样有多个想分析的目标,也可以对想要分析的每个目标进行高灵敏度的成像质谱分析。

[0056] <将基质配置在表面的基材>

[0057] 作为将基质配置在表面的基材,没有特别限制,可根据目的适当选择。在下文中,将“将基质配置在表面的基材”称为“基质板”。

[0058] 基质板具有基质和基材。

[0059] <<基质>>

[0060] 作为基质,只要是能抑制试样的光分解和热分解、且能抑制试样的破碎(开裂)的材料,无特别限制,可根据目的进行适当选择。

[0061] 作为基质,可以列举有公知的基质,例如,可以列举1,8-二氨基萘(1,8-Diaminonaphthalene)(1,8-DAN)、2,5-二羟基苯甲酸(2,5-Dihydroxybenzoic acid)(以下有时简称为“DHBA”)、1,8-蒽二羧酸二甲酯(1,8-Anthracenedicarboxylic Acid Dimethyl ester)、白喹啉(Leucoquinizarin)、脱氧茜素(Anthrarobin)、1,5-二氨基萘(1,5-Diaminonaphthalene)(1,5-DAN)、6-氮杂-2-甲基硫氧嘧啶(6-Aza-2-thiothymine)、1,5-二氨基蒽醌(1,5-Diaminoanthraquinone)、1,6-二氨基芘(1,6-Diaminopyrene)、3,6-二氨基咪唑(3,6-Diaminocarbazole)、1,8-蒽二羧酸(1,8-Anthracenedicarboxylic Acid)、去

甲哈尔满(Norharmane)、1-芘丙胺氢氧化物(1-Pyrenepropylamine hydrochloride)、9-氨基芴氢氧化物(9-Aminofluorene Hydrochloride)、阿魏酸(Ferulic acid)、二硫醇(Dithranol)、2-(4-羟基苯乙酮)苯甲酸(2-(4-Hydroxyphenylazo)benzoic acid)(HABA)、反-2-[3-(4-叔丁基苯基)-2-甲基-2-亚丙烯基]丙二腈(trans-2-[3-(4-tert-Butylphenyl)-2-methyl-2-propenylidene]malononitrile)(DCTB)、反-4-苯基-3-丁烯-2-酮(trans-4-Phenyl-3-buten-2-one)(TPBO)、反-3-吲哚丙烯酸(trans-3-Indoleacrylic acid)(IAA)、1,10-邻二氮杂菲(1,10-phenanthroline)、5-硝基-1,10-邻二氮杂菲(5-Nitro-1,10-phenanthroline)、 α -氰-4-羟基桂皮酸(α -Cyano-4-hydroxycinnamic acid)(CHCA)、芥子酸(Sinapic acid)(SA)、2,4,6-三羟基苯乙酮(2,4,6-Trihydroxyacetophenone)(THAP)、3-羟基吡啶酸(3-Hydroxypicolinic acid)(HPA)、邻氨基苯甲酸(Anthranilic acid)、烟酸(Nicotinic acid)、3-氨基喹啉(3-Aminoquinoline)、2-羟基-5-甲氧基苯甲酸(2-Hydroxy-5-methoxybenzoic acid)、2,5-二甲氧基苯甲酸(2,5-Dimethoxybenzoic acid)、4,7-邻二氮杂菲(4,7-Phenanthroline)、p-香豆酸(p-Coumaric acid)、1-异喹啉醇(1-Isoquinolinol)、2-吡啶甲酸(2-Picolinic acid)、1-芘丁酸酰肼(1-Pyrenebutanoic acid,hydrazide)(PBH)、1-芘丁酸(1-Pyrenebutyric acid)(PBA)、1-芘甲胺氢氧化物(1-Pyrenemethylamine hydrochloride)(PMA)、金、银、铂(白金)、钴等。其中,优选具有结晶成针状的性质的基质,例如,优选例如2,5-二羟基苯甲酸(DHBA)。

[0062] 在该MALDI质谱分析用测定试样制备方法中,作为从包含基材的基质板飞行的基质,可以在上述那样的各种基质中选择一种,但优选二种以上(包括二种)。

[0063] 另外,作为从包含基材的基质板飞行的二种以上基质,在MALDI质谱分析对象的试样中,优选配置在相互不同的规定位置。由此,在一个测定试样可以分开地或分别地涂布二种以上基质,对一个测定试样可以进行二种以上的成像质谱分析,这一点很有利。

[0064] <<基材>>

[0065] 作为基材,对其形状、结构、大小、材质等没有特别限制,可根据目的进行适当选择。

[0066] 作为基材的形状,只要在表面承载基质,可从背面照射激光束或光学涡旋激光束,则没有特别限制,可根据目的进行适当选择。另外,作为平板状的基材形状,例如可以列举玻璃载片等。

[0067] 作为基材的材质,只要透过激光束或光学涡旋激光束,没有特别限制,可根据目的适当选择。透过激光束或光学涡旋激光束的基材之中,从透过率和耐热性角度考虑,优选以氧化硅为主要成分的各种玻璃等的无机材料、透明性的耐热塑料、弹性体等的有机材料。

[0068] 作为基材的表面粗糙度Ra,没有特别的限制,可以根据目的适当选择,从抑制激光束或光学涡旋激光束的折射散射、不使得赋予基质的能量降低的角度考虑,优选表面及背面都为1 μ m以下。另外,如果表面粗糙度Ra处于所述优选范围内,则能够抑制附着在试样上的基质的平均厚度偏差,能使其附着所需量的基质,在这一点上有利。

[0069] 表面粗糙度Ra可根据JIS B0601进行测量,例如可以使用共焦式激光显微镜(KEYENCE公司制)或触针式表面形状测量装置(Dektak150,Bruker AXS公司制)进行测量。

[0070] [基质板的制作方法]

[0071] 作为基板的制作方法,没有特别的限制,可根据目的适当选择,例如,可以列举以下方法:将由下文所述的粉体形成装置结晶化的基质配置在玻璃载片上,制备基板。

[0072] 作为制备示例基板的方法,首先,制备在溶剂中混合基质的基质溶液。

[0073] 作为溶剂,没有特别限制,可根据目的适当选择,可以列举例如TFA、TFA-乙腈、THF、甲醇等。

[0074] 其次,将制备的基质溶液收容在图1A~图1C表示的粉体形成装置1的原料收容器13中。

[0075] 图1A是表示粉体形成装置整体的一个例子的概要图。图1B是图1A的液滴形成单元中的液滴形成头的概略图。图1C是图1A的液滴形成单元的A-A'线截面图。

[0076] 图1A所示的粉体形成装置1主要包括液滴形成单元10和干燥捕集单元30。液滴形成单元10配置多个作为液滴化手段的液滴排出头11,液柱共振液室是具有通过排出孔与外部连通的液体喷射区域的液室,在规定条件下产生液柱共振驻波,液滴排出头11将所述液柱共振液室内的基质溶液作为液滴,从排出孔喷射。

[0077] 在各液滴排出头11的两侧设有气流通12,由气流产生手段所产生的气流通过所述气流通12,使得从液滴排出头11排出的基质溶液的液滴朝干燥捕集单元30侧流出。另外,液滴形成单元10包括原料收容器13和液体循环泵15。所述原料收容器13收纳作为基质原料的基质溶液14,所述液体循环泵15将收纳在原料收容器13的基质溶液14通过液体供给管16供给到液滴排出头11内的后述的液体共有供给通道17,进而,为了通过液体返回管22返回到原料收容器13,所述液体循环泵15压送液体供给管16内的基质溶液14。进一步说,液滴排出头11如图1B所示,包括液体共有供给通道17以及液柱共振液室18。液柱共振液室18与长方向两端的壁面之中设置在一壁面的液体共有供给通道17连通。另外,液柱共振液室18包括基质排出孔19以及振荡产生手段20。所述基质排出孔19向与两端壁面连接的壁面之中一个壁面排出基质液滴21,所述振荡产生手段20设置在与基质排出孔19相对的壁面,且为了形成液柱共振驻波,产生高频振动。高频电源与振荡产生手段20连接。

[0078] 另外,图1A所示的干燥捕集单元30包含腔室31及基质捕集部构成。在腔室31内,由气流产生手段发生的气流和下降气流33合流形成大的下降气流。从液滴形成单元10的液滴排出头11喷射的基质液滴21不仅因重力,还由于下降气流33向下方运送,因此,可以抑制喷射的基质液滴21因空气阻力减速。由此,能防止发生以下不良状况:当连续喷射基质液滴21时,先前喷射的基质液滴21因空气阻力减速,后喷射的基质液滴21追上先前喷射的基质液滴21,基质液滴21之间粘合,基质液滴21的结晶直径产生偏差。作为气流产生手段,也可以采用在上游部分设置送风机加压的方法,或者由基质捕集部吸引减压的方法。另外,在基质捕集部中,配置旋转气流发生装置,使其产生绕与垂直方向平行的轴旋转那样的旋转气流。而且,在配置于腔室31下方的基材201上,承载干燥、结晶化的基质的粉体。

[0079] 这样得到的基质粉体由于结晶直径的偏差小,所以可以进行再现性高的分析。另外,由于该基质粉体通过干燥使溶剂挥发,因此,几乎不含溶剂,因此,很少发生像以往喷雾等方法那样,在试样涂布基质溶液,因溶剂破坏测定试样的生物组织。进而,通过质谱分析,几乎没有溶剂挥发,因此,通过使用该基质的粉体,可在医疗现场和临床试验中进行,具有在现场得到分析结果的优点。

[0080] 作为配置在基材表面的基质形状,无特别限制,可根据目的适当选择,可以列举例

如单层、多层状、点状等。其中,优选单层和点状的至少一种。如果基质形状是单层和点状的至少某个,则在基体表面能容易地配置基质,这一点上有利。

[0081] [向基质板照射激光束的方法(激光束照射手段)]

[0082] 作为向基质板照射激光束的方法(激光束照射手段),没有特别限制,可以根据目的适当选择,例如,优选以下那样的激光束照射手段。

[0083] 在此,图2是表示在本发明的MALDI质量分析用测定试样制备方法中可使用的激光束照射手段的一个示例的概略图。

[0084] 在图2中,激光束照射手段140向在基材201承载的基质202照射激光束L,因激光束L的能量使基质202飞行,附着在玻璃载片302上的试样切片301上。

[0085] 激光束照射手段140包括激光光源141、束直径变更手段142、束波长变更手段143、能量调整滤光器144、以及束扫描手段145。另外,基质板200由基材201和基质202组成,测定试样300由试样切片301和玻璃载片302组成。

[0086] 激光光源141产生脉冲振荡的激光束L,照射到束直径变更手段142。

[0087] 作为激光光源141,例如可以列举固态激光器、气体激光器、半导体激光器等。

[0088] 束直径变更手段142配置在激光光源141产生的激光束L的光路的激光光源141的下游,改变激光束L径。

[0089] 作为束直径变更手段142,例如是聚光透镜等。

[0090] 作为激光束L的束直径,没有特别限制,可以根据目的适当选择,但优选5 μm 以上、100 μm 以下。若激光束L的束直径在优选范围内,则能配置与现有MALDI的束直径相对应的基质,这一点上有利。

[0091] 束波长变更手段143配置在激光束L光路中的束直径变更手段142的下游,将激光束L的波长变更为可吸收基质202的波长。

[0092] 作为束波长变更手段,只要能满足以下条件:通过对激光束赋予圆偏振光,成为以下式(1)所示的总转矩 $J_{L,S}$ 为 $|J_{L,S}| \geq 0$,则没有特别的限制,可根据目的适当选择。作为束波长变更手段,例如可以列举1/4波长板等。1/4波长板的情况下,可以将光轴设置在+45°或-45°以外,向光学涡旋激光束赋予椭圆状的圆偏振光(椭圆偏振光),但是,优选将光轴设置在+45°或者-45°,对激光束赋予圆状的圆偏振光,满足上述条件。由此,激光束照射手段140可增大光吸收材料稳定飞行、以抑制飞散的形状附着在被附着物上的效果。

$$[0093] \quad J_{L,S} = \epsilon_0 \left\{ \omega L I - \frac{1}{2} \omega S r \frac{\partial I}{\partial r} \right\} \quad \cdot \cdot \cdot \quad (1)$$

[0094] 在式(1)中, ϵ_0 是真空中介电常数, ω 是光的角频率,L是拓扑电荷(topological charge),I是与下式(2)表示的激光束的涡次数对应的轨道角动量,S是相对圆偏振光的自旋角动量,r是圆筒坐标系的矢径。

$$[0095] \quad I(r) = r^{(2|L|)} \exp\left(-\frac{r^2}{\omega_0^2}\right) \quad \cdot \cdot \cdot \quad (2)$$

[0096] 在式(2)中, ω_0 为光束腰围尺寸。

[0097] 所谓拓扑电荷是指激光束圆筒坐标系中的方位方向的周期边界条件出现的量子

数。另外,所谓光束腰围尺寸是指激光束的束直径的最小值。

[0098] L是由波长板的螺旋波面卷数(turns)决定的参数。S是由波长板的圆偏振光的朝向决定的参数。L和S均为整数。另外,L和S的符号分别表示螺旋的方向(顺时针方向、逆时针方向)。

[0099] 如果激光束中的总转矩设定为J,则可以表示为 $J=L+S$ 。

[0100] 作为束波长变更手段143,可以列举例如KTP结晶、BBO结晶、LBO结晶、CLBO结晶等。

[0101] 能量调整滤光器144配置在激光束L光路中的束波长变更手段143的下游,若使激光束L透过,则为了使得基质202飞行,变更为合适的能量。作为能量调整滤光器144,例如,可列举ND滤光器、玻璃板等。

[0102] 束扫描手段145配置在激光束L光路中的能量调整滤光器144的下游,设有反射镜146。

[0103] 反射镜146通过反射镜驱动手段在图2中箭头S表示的扫描方向可移动,使得激光束L在基材201承载的基质202的任意位置反射。

[0104] 基质202照射经过能量调整滤光器144的激光束L,接受激光束L的径范围中的能量飞行,附着在试样切片301。

[0105] 作为激光束L,没有特别限制,可根据目的适当选择,可以列举例如光学涡旋激光束、高斯光束等。其中,从其激光器特性可以看出,不使基质飞散,提高转印到试样的条件的鲁棒性(坚稳性),从这一点考虑,优选光学涡旋激光束。

[0106] 在此,对光学涡旋激光束进行说明。

[0107] 一般的激光束由于相位一致,具有如图9A所示的平面状的等位相

[0108] 面(波面)。由于激光束的坡印廷向量的方向是平面状的等位相面的正交方向,成为与激光束的照射方向相同方向,因此,激光光束照射到光吸收材料时,相对光吸收材料,在照射方向作用力。但是,激光束截面的光强度分布如图9B所示,束中心是最强的正态分布(高斯分布),因此,光吸收材料容易飞散。另外,若进行位相分布观察,则如图9C所示,确认没有相位差。

[0109] 与此相对,光学涡旋激光束如图10A所示,具有螺旋状的等位相面。由于光学涡旋激光束的坡印廷向量方向相对于螺旋状的等位相面为正交方向,因此,光学涡旋激光束照射到光吸收材料时,在正交方向作用力。

[0110] 因此,如图10B所示,光强度分布成为光束中央为0的凹陷的面包圈状分布,照射光学涡旋激光束的光吸收材料被施加作为放射压力的面包圈状的能量。于是,照射光学涡旋激光束的光吸收材料沿着光学涡旋激光束的照射方向飞行,在难以飞散的状态下附着到被附着物。若进行相位分布的观察,则确认如图10C所示,发生相位差。

[0111] 图11A是表示使得一般激光束照射光吸收材料时一例的照片。图11B是表示使得光学涡旋激光束照射光吸收材料时一例的照片。

[0112] 若比较图11A和图11B,可以确认图11A比图11B光吸收材料飞散。由此可知,照射光学涡旋激光束的光吸收材料被施加作为放射压力的面包圈状的能量,沿光学涡旋激光束的照射方向飞行,在难以飞散的状态下附着到被附着物。

[0113] 作为判别是否光学涡旋激光束的方法,没有特别限制,可根据目的适当选择,例如,可以列举所述的位相分布的观察、干扰检测等,干扰检测一般方法。

[0114] 干扰检测可以使用激光束廓线仪 (Spiricon公司制激光束廓线仪、滨松Photonics公司制激光束廓线仪等) 观察, 干扰检测结果的一个示例表示在图12A、图12B。

[0115] 图12A是表示光学涡旋激光束的干扰检测结果一例的说明图, 图12B是表示中心具有光强度0的点的激光束的干扰检测结果一例的说明图。

[0116] 若干扰检测光学涡旋激光束, 如图12A所示, 能量分布呈面包圈状, 可以确认, 与图9C相同, 是在中心具有光强度0的点的激光束。

[0117] 另一方面, 如果对中心具有光强度0的点的一般激光束进行干扰检测, 则如图12B所示, 与图12A所示的光学涡旋激光束的干扰检测类似, 但面包圈状部的能量分布不均匀, 因此, 可以确认与光学涡旋激光束的差异。

[0118] 若激光束L是光学涡旋激光束, 则飞行的基质202因光学涡旋激光束赋予的陀螺效果, 能够抑制向周边飞散, 且附着在试样切片301, 这一点有利。

[0119] 为了转换为光学涡旋激光束, 可以通过使用例如衍射光学元件、多模光纤、液晶相位调制器等进行。

[0120] (MALDI质谱分析用测定试样)

[0121] 作为MALDI质谱分析用测定试样, 只要具有MALDI质谱分析对象的试样以及在试样上配置在规定位置的二种以上的基质, 没有特别限制, 可根据目的进行适当选择。当MALDI质谱分析时, MALDI质谱分析用测定试样必须载置在导电性的基板上。

[0122] 作为MALDI质谱分析用测定试样, 可相对MALDI质谱分析对象试样的规定位置, 配置为从基材使得基质多次飞行。如果能配置为从基材使得基质多次飞行, 则能调整基质的量, 在这一点上有利。

[0123] <试样>

[0124] 作为MALDI质谱分析对象试样, 只要能以MALDI质谱分析进行分析, 没有特别限制, 可根据目的进行适当选择, 可以列举例如冷冻脑组织、动物全身切片、种子、印刷图像等。

[0125] (MALDI质谱分析方法)

[0126] 本发明的MALDI质谱分析方法只要采用本发明的MALDI质谱分析用测定试样进行MALDI质谱分析, 没有特别限制, 可根据目的进行适当选择。

[0127] 作为MALDI质谱分析方法, 可以通过例如MALDI-TOF-MS (Bruker Daltonics公司制) 进行。

[0128] (MALDI质谱分析用测定试样制备程序)

[0129] 本发明的MALDI质谱分析用测定试样制备程序使得计算机实行以下处理: 根据MALDI质谱分析对象试样的位置信息, 将用于制备MALDI质谱分析用测定试样的基质配置在基材表面, 将激光束照射到基材的与配置基质侧相反侧的基材表面, 使得基质从基材飞行, 配置在MALDI质谱分析对象试样的规定位置。

[0130] 本发明的MALDI质谱分析用测定试样制备程序用于合适地实施本发明的MALDI质谱分析用测定试样制备方法。

[0131] 也就是说, 本发明的MALDI质谱分析用测定试样制备程序通过使用作为硬件资源的计算机等, 可以执行本发明的MALDI质谱分析用测定试样制备方法。另外, 本发明的MALDI质谱分析用测定试样制备程序也可由一个或多个计算机或服务器的至少一个执行。

[0132] 在本发明的MALDI质谱分析用测定试样制备程序的处理中, 将配以各自不同种类

的基质的多个基板预先设置在规定位置上,在将载置测定试样的ITO涂层玻璃载片固定在规定位置的状态下进行。

[0133] 本发明的MALDI质谱分析用测定试样制备程序的处理例如可以由图3A和图3B所示那样的MALDI质谱分析用测定试样制备装置实行。

[0134] 图3A是表示MALDI质谱分析用测定试样制备装置的硬件一例的方框图。

[0135] 如图3A所示,该MALDI质谱分析用测定试样制备装置100包括鼠标110、CPU120、显示器130、激光束照射手段140、预更换机构150、以及存储手段160。CPU120与各部连接。

[0136] 鼠标110从用户那里接收通过后述的输入部110a使得“基质的种类”和“照射激光束的测定试样的位置”的信息对应的照射数据。另外,鼠标110接受对于MALDI质谱分析用测定试样制备装置100的其他输入。

[0137] CPU120是一种处理器,是进行各种控制及运算的处理装置。CPU120通过执行存储手段160等设置的固件等,实现各种功能。CPU120与后述的控制部120a对应。

[0138] 显示器130表示根据后述的输出部130a接收各种指示的画面。

[0139] 激光束照射手段140与例如图2所示的激光束照射手段一样,通过后述的输出部130a,将激光束照射到基板的规定位置。

[0140] 板更换机构150是由后述的板更换部150a更换收纳在装置内的配置各种基质的基板的机构。

[0141] 存储手段160存储使得MALDI质谱分析用测定试样制备装置100动作的各种程序。

[0142] 图3B是表示MALDI质谱分析用测定试样制备装置的功能一例的方框图。

[0143] 如图3B所示,该MALDI质谱分析用测定试样制备装置100包括输入部110a、控制部120a、输出部130a、照射部140a、板更换部150a、以及存储部160a。控制部120a与各部分连接。

[0144] 输入部110a根据控制部120a的指示,通过鼠标110从用户接受使得“基质的种类”和“照射激光束的测定试样的位置”的信息对应的照射数据。

[0145] 照射数据的接收也可以例如在对载置于ITO涂层玻璃载片上的测定试样进行摄影的图像上,输入基质的种类和照射位置。

[0146] 输入部110a接受来自用户的其他输入。

[0147] 控制部120a将在输入部110a接受的照射数据存储于存储部160a。另外,控制部120a控制MALDI质谱分析用测定试样制备装置100整体的动作。

[0148] 输出部130a根据控制部120a的指示,在显示器130表示接受各种指示的画面。

[0149] 照射部140a根据控制部120a的指示,使激光束照射手段140动作,可使激光束照射由板更换部150a配置的基板。

[0150] 板更换部150a按照基于照射数据的控制部120a的指示,更换基板。基板在装置内收纳多个,分别不同种类的基质的粉体配置在板上,由板交换机构150更换。

[0151] 存储部160a按照控制部120a的指示,将在输入部110a接收到的照射数据及各种程序等存储于存储手段160。

[0152] 图3C是表示本发明的MALDI质谱分析用测定试样制备程序的处理步骤一例的流程图。

[0153] 在步骤S101中,若输入部110a通过鼠标110从用户接受使得“基质的种类”和“照射

激光束的测定试样的位置”的信息对应的照射数据,则处理转移到S102。

[0154] 在步骤S102中,若控制部120a根据照射数据使激光束照射手段140的照射位置移动,则将处理转移到S103。

[0155] 在步骤S103中,若照射部140a通过激光束照射手段140照射配置在基质板上的基质,将基质配置在试样切片,则将处理转移到S104。

[0156] 在步骤S104中,控制部120a判定照射数据的内容是否全部完成。若控制部120a判定照射数据的内容全部完成,则结束本处理,如果判定照射数据的内容没有全部完成,则将处理转移到S105。

[0157] 在步骤S105中,控制部120a根据照射数据,判定是否需要更换基质板。若控制部120a判定需要更换基质板,则将处理转移到S106,若判定不需要更换基质板,则处理返回到S102。

[0158] 在步骤S106中,若板更换部150a进行基质板的更换,则使处理返回S102。

[0159] 这样,本发明的MALDI质谱分析用测定试样制备程序使得计算机实行以下处理:根据MALDI质谱分析对象试样的位置信息,将用于制备MALDI质谱分析用测定试样的基质配置在基材表面,将激光束照射到基材的与配置基质侧相反侧的基材表面,使得基质从基材飞行,配置在MALDI质谱分析对象试样的规定位置。

【实施例】

[0160] 以下,说明本发明的实施例,但本发明并不局限于这些实施例。

[0161] 说明以下的实施例及参考例:通过图2所示的激光束照射手段140,将脉冲振荡的光学涡旋激光束分别照射到二种基质A和B,在一个试样切片配置二种基质的点的实施例和参考例。

[0162] (实施例1)

[0163] [基质溶液的制备]

[0164] 首先,将0.1容积%TFA(Thermo Fisher Scientific公司制)和0.1容积%TFA-乙腈(Thermo Fisher Scientific公司制)等量混合作为溶剂,将芥子酸(Sinapic acid、基质A)的饱和溶液制备作为基质溶液A。

[0165] 其次,将以THF(东京化成工业株式会社制)为溶剂的二硫醇(Dithranol、基质B)10mg/mL作为基质B制备。

[0166] [二种基质板的制作]

[0167] 采用图1A~图1C所示的粉体形成技术将制备的基质溶液A形成一次平均粒径100 μ m的基质A的粉体,在作为基材的玻璃载片(S2441、超级霜白、松浪硝子工业株式会社制)表面形成平均厚度100 μ m的基质A的粉体层,制作图4A的照片中所示的基质板A。

[0168] 将基质溶液A由基质溶液B取代,除此以外,与基质板A相同,形成一次平均粒径20 μ m的基质B的粉体,在作为基材的玻璃载片(S2441、超级霜白、松浪硝子工业株式会社制)表面形成平均厚度100 μ m的基质B的粉体层,制作图4B的照片中所示的基质板B。

[0169] [试样切片的制作]

[0170] 首先,将作为试样的冷冻小鼠脑组织(从COSMO BIO公司购入)放入离心管,在multi-beads shocker(MB2000、安井器机公司制)将粉碎用珠放入进行粉碎,然后,用液氮

将离心管整体在 -196°C 冷却,再次粉碎。

[0171] 其次,用专用磁铁去除离心管内破碎用珠,在常温下溶解后,用桌上离心机(MCF-2360、株式会社LMS制)降速,在液氮内静置3小时,使其完全再冻结。将再冻结的试样用冷冻切片机切断,制作平均厚度 $10\mu\text{m}$ 的试样切片,如图5所示,载置在ITO涂层玻璃载片(无MAS涂层、 100Ω 、松浪硝子工业株式会社制)上。

[0172] [激光束照射手段的准备]

[0173] 激光束照射手段使用图2所示的激光束照射手段140。

[0174] 具体来说,激光束源(YAG)采用激发YAG晶体使其激光振荡的YAG激光器。使用该激光束源,使其产生一脉冲的激光束,该激光束的波长为 $1,064\text{nm}$ 、束直径为 $1.25\text{mm}\times 1.23\text{mm}$ 、脉冲宽度为2毫微秒、脉冲频率为 20Hz 。将所产生的一脉冲的激光束照射到作为束直径变更部件的聚光透镜(SIGMA光机公司制,YAG激光聚光透镜),使其照射到基质时的束直径为 $80\mu\text{m}\times 80\mu\text{m}$ 。将经过上述束直径变更部件的上述激光束照射到作为所述束波长变更元件使用的LBO晶体(CESTEC公司制),所述波长由 $1,064\text{nm}$ 变更为 532nm 后,进而,用LBO晶体,将 $1,064\text{nm}$ 的激光光束和 532nm 的激光束使用执行产生和频率的波长变更手段变更为 355nm 的激光光束。其次,使得在所述波长变更手段变更的激光束通过螺旋位相板(Luminex公司制、Vortex位相板),使其转换成光学涡旋激光束。接着,使由螺旋位相板转换的光学涡旋激光束通过配置在螺旋位相板下游的 $1/4$ 波长板(QWP,株式会社光学技研制)。此时,将螺旋位相板和 $1/4$ 波长板的光学轴设定为 $+45^{\circ}$,以使得用式(1)表示的总转矩 J 为2。

[0175] 使得转换后的光学涡旋激光束通过能量调整滤光器(SIGMA光机公司制、ND滤光器),调整照射到基质时的激光输出,设为 $50\mu\text{J}/\text{点}$ 。

[0176] [MALDI质谱分析用测定试样的制作]

[0177] 首先,在基质板A的表面形成基质A的粉体层,使得该基质A的粉体层与ITO涂层玻璃载片上的试样切片相对,设置为能从基质板A的背面,通过激光束照射手段垂直照射光学涡旋激光束。试样切片和基质A的粉体层之间的间隙设为 $500\mu\text{m}$ 。

[0178] 接着,如图6A所示,从基质板A的背面垂直照射光学涡旋激光束,使基质A的粉体从基质板A飞行,配置在试样切片的规定位置。

[0179] 接着,从基质板A更换到基质板B后,如图6B所示,从基质B的背面垂直照射光学涡旋激光束,使基质B的粉体从基质板B飞行,配置在未配置基质A的试样切片的规定位置。这样,制作MALDI质谱分析用测定试样。图13A是表示实施例1及2的MALDI质谱分析用测定试样的制备方法的概念图。图13B是表示使用实施例1的MALDI质谱分析用测定试样的制备方法的结果的光学显微镜照片的二值化图像一例的图。如图13A和图13B所示,使用光学涡旋激光束时,能以几乎与照射范围同等范围的面积转印基质B。

[0180] [MALDI质谱分析]

[0181] 使用MALDI-TOF-MS(Bruker Daltonics公司制),对配有二种基质的粉体的MALDI质谱分析用测定试样进行MALDI质谱分析。

[0182] MALDI质谱分析在正离子检测模式中,将检测的质荷比(m/z)范围设为 $250\sim 600$,在直径约 1mm 的点内部作成纵20点 \times 横20点的数据点,将得到的光谱平均化。

[0183] 作为MALDI质谱分析的结果,将使用基质A(芥子酸)的光谱图表示在图7A,使用基质B(二硫醇)的光谱图表示在图7B。

[0184] 如图7A和图7B所示,在同一MALDI质谱分析用测定试样中,能得到因基质种类不同而引起的检测成分不同的结果。在以往的喷雾或蒸镀等的基质涂布方法中,在一个试样切片上只能使用一种基质,因此,不能得到这样的结果。另外,二硫醇的检出强度是芥子酸的检测强度的60倍左右,在同一试样中使用一种基质场合,难以用芥子酸进行检测。

[0185] (实施例2)

[0186] 在实施例1中,将使用的激光束源的波长变更为532nm,使用执行产生和频率的波长变更手段变更为355nm的激光光束,除此以外,与实施例1相同,制作MALDI质谱分析用测定试样。

[0187] 其结果,在实施例1的装置中,省略由作为所述激光束波长变更元件使用的LBO晶体(CESTEC公司制)将所述激光束的波长从1,064nm变更为532nm的机构,可以制作与实施例1同样的试样。

[0188] (实施例3)

[0189] 在实施例1中,不通过螺旋位相板(Luminex公司制、Vortex位相板),使用高斯激光束,除此以外,与实施例1相同,制作MALDI质谱分析用测定试样。

[0190] 图14A是表示实施例3的MALDI质谱分析用测定试样的制备方法的概念图。图14B是表示使用实施例3的用高斯激光束的MALDI质谱分析用测定试样的制备方法的结果的光学显微镜照片的二值化图像一例的图。如图14A和图14B所示,即使使用高斯激光束场合,也可以毫无问题地制作MALDI质谱分析用测定试样。

[0191] 图15A是表示使用光学涡旋激光束转印的试样的显微镜图像一例的图。图15B是表示使用高斯激光束转印的试样的显微镜图像一例的图。如图15A所示,使用光学涡旋激光束场合,与图15B所示使用高斯激光束相比可知,在抑制飞散以及将基质转印到目标部位上很优异。因此,可以缩小转印的基质的间隔,以高密度转印多种基质。

[0192] (参考例)

[0193] 在实施例1中,不是同一试样切片,而是在不同的试样切片上分别使用基质A和B,分别制作MALDI质谱分析用测定试样,除此之外,与实施例1相同,进行MALDI质谱分析,将使用基质A(芥子酸)的光谱图表示在图8A,使用基质B(二硫醇)的光谱图表示在图8B。

[0194] 如图8A和图8B所示,得到与实施例的图7A和图7B相同的结果。也就是说,在本发明的MALDI质谱分析方法中,由于能在一个试样切片上配置二种以上的基质,因此,即使只存在一个试样,并且希望对二种以上的基质进行MALDI质谱分析场合,也可以分别得到各基质的MALDI质谱分析结果。

[0195] 这样,本发明的MALDI质谱分析用测定试样制备方法由于在一个试样上可配置二种以上的基质,因此,即使仅有一个试样,也可以分别以高灵敏度测定如蛋白质、脂质、核苷酸等的想分析的目标。因此,本发明的MALDI质谱分析用测定试样制备方法即使对于一个试样而想分析的目标有多个场合,也可以对想要分析的每个目标进行高灵敏度的成像质谱分析。由此,本发明的MALDI质谱分析用测定试样制备方法也可合适地用于给药分析等。

[0196] 如上所述,本发明的MALDI质谱分析用测定试样制备方法将用于制备MALDI质谱分析用测定试样的基质配置在基材表面,将激光束照射到基材的与配置基质侧相反侧的基材表面,使得基质从基材飞行,配置在MALDI质谱分析对象试样的规定位置。由此,本发明的MALDI质谱分析用测定试样制备方法当实行MALDI质谱分析时,可在一个试样配置二种以上

的基质。

[0197] 作为本发明的形态,例如,如下形态:

[0198] <1>一种MALDI质谱分析用测定试样制备方法,其特征在于:

[0199] 基材将用于制备MALDI质谱分析用测定试样的基质配置在表面,通过将激光束照射所述基材的与配置所述基质侧相反侧的所述基材的表面,使得所述基质从所述基材飞行,使其配置在MALDI质谱分析对象的试样的规定位置。

[0200] <2>上述<1>记载的MALDI质谱分析用测定试样制备方法,其中,从所述基材飞行的所述基质为二种以上。

[0201] <3>上述<2>记载的MALDI质谱分析用测定试样制备方法,其中,使得从所述基材飞行的二种以上的所述基质配置在所述MALDI质谱分析对象试样的互不相同的规定位置。

[0202] <4>上述<1>~<3>任意一个记载的MALDI质谱分析用测定试样制备方法,其中,配置为相对所述MALDI质谱分析对象试样的规定位置,使得所述基质从所述基材多次飞行。

[0203] <5>上述<1>~<4>任意一个记载的MALDI质谱分析用测定试样制备方法,其中,所述激光束为光学涡旋激光束。

[0204] <6>上述<1>~<5>任意一个记载的MALDI质谱分析用测定试样制备方法,其中,所述激光束的照射直径为5 μ m以上、100 μ m以下。

[0205] <7>上述<1>~<6>任意一个记载的MALDI质谱分析用测定试样制备方法,其中,配置在所述基材表面的所述基质为层状及点状的至少某个。

[0206] <8>一种用于上述<1>~<7>任意一个记载的MALDI质谱分析用测定试样制备方法的MALDI质谱分析用测定试样制备装置,其特征在于,包括将激光束照射所述基材表面的照射手段。

[0207] <9>一种MALDI质谱分析用测定试样,其特征在于,包括:

[0208] MALDI质谱分析对象的试样;以及

[0209] 在所述试样上配置在所述规定位置的二种以上的基质。

[0210] <10>一种MALDI质谱分析方法,其特征在于:

[0211] 使用上述<9>记载的MALDI质谱分析用测定试样进行MALDI质谱分析。

[0212] <11>一种MALDI质谱分析用测定试样制备程序,其特征在于,使得计算机实行以下处理:

[0213] 根据MALDI质谱分析对象试样的位置信息,基材将用于制备MALDI质谱分析用测定试样的基质配置在表面,通过将激光束照射所述基材的与配置所述基质侧相反侧的所述基材的表面,使得所述基质从所述基材飞行,使其配置在MALDI质谱分析对象的试样的规定位置。

[0214] <12>一种计算机可读的记录介质,其特征在于,其中存储MALDI质谱分析用测定试样制备程序,该程序通过处理器执行,实现以下处理:

[0215] 根据MALDI质谱分析对象试样的位置信息,基材将用于制备MALDI质谱分析用测定试样的基质配置在表面,通过将激光束照射所述基材的与配置所述基质侧相反侧的所述基材的表面,使得所述基质从所述基材飞行,使其配置在MALDI质谱分析对象的试样的规定位置。

置。

[0216] 若按照上述<1>~<7>任意一个记载的MALDI质谱分析用测定试样制备方法、上述<8>记载的MALDI质谱分析用测定试样制备装置、上述<9>记载的MALDI质谱分析用测定试样、上述<10>记载的MALDI质谱分析方法、上述<11>记载的MALDI质谱分析用测定试样制备程序、上述<12>记载的计算机可读的记录介质,能解决以往技术中的诸问题,实现本发明的目的。

[0217] 上面参照附图说明了本发明的实施形态,但本发明并不局限于上述实施形态。在本发明技术思想范围内可以作种种变更,它们都属于本发明的保护范围。

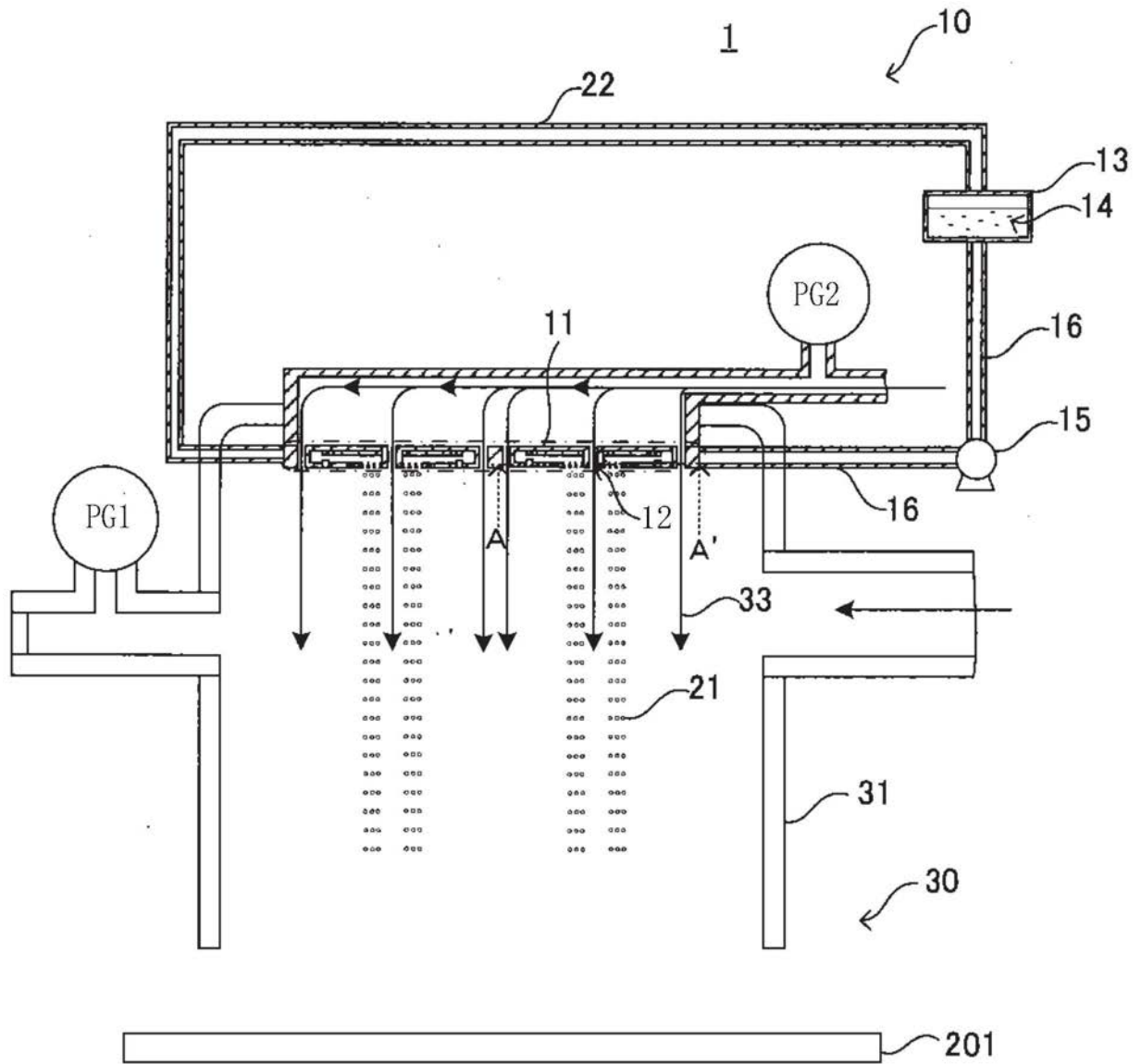


图1A

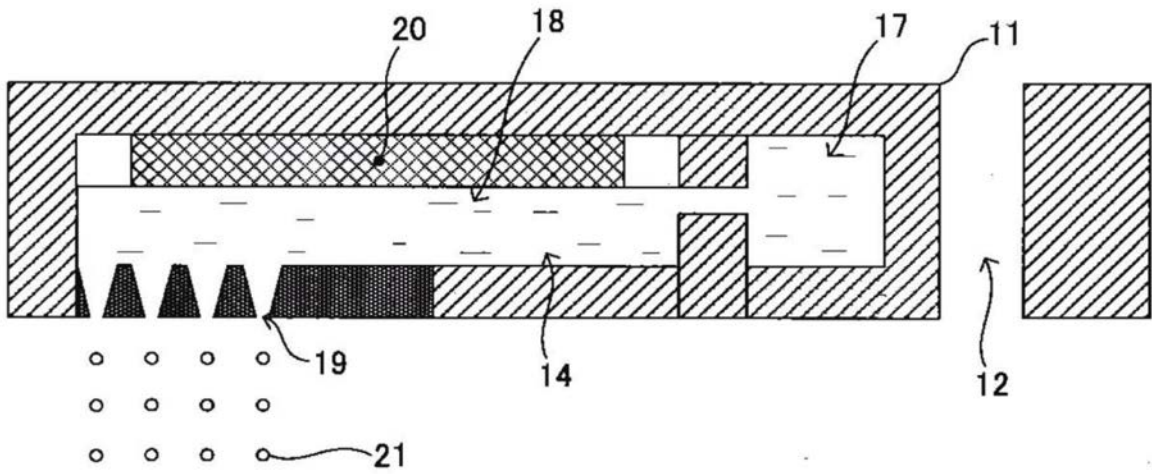


图1B

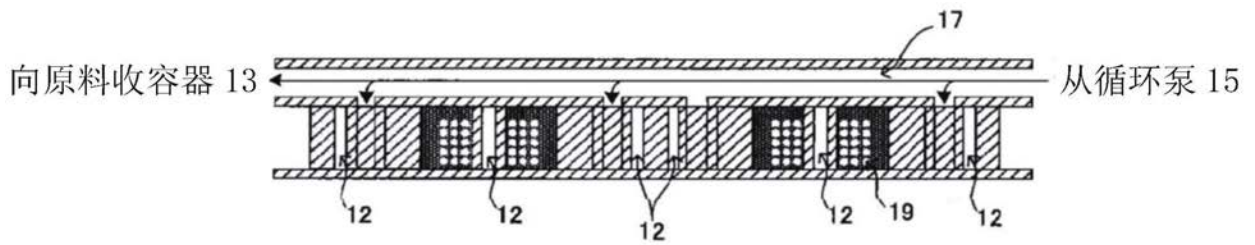


图1C

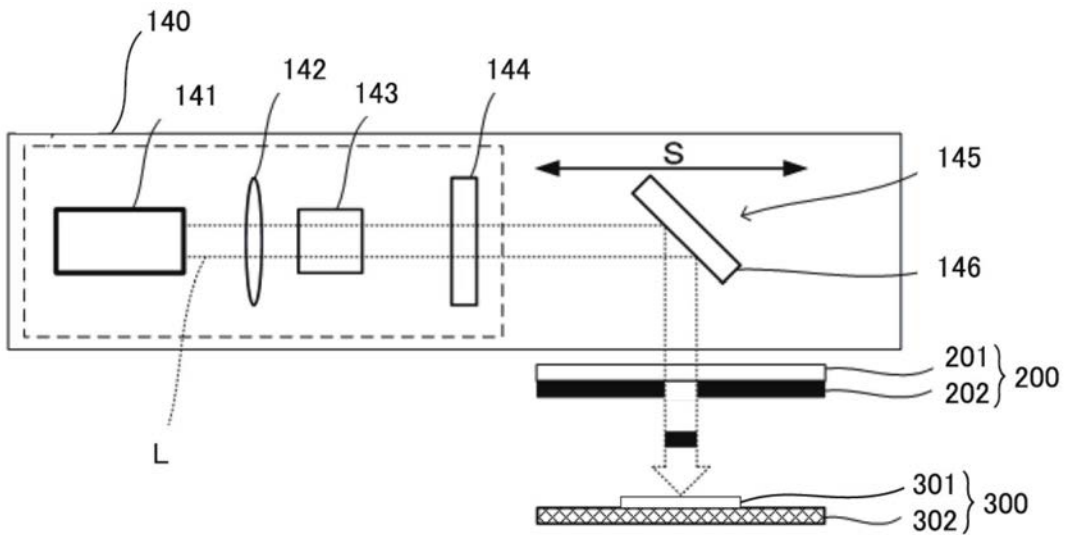


图2

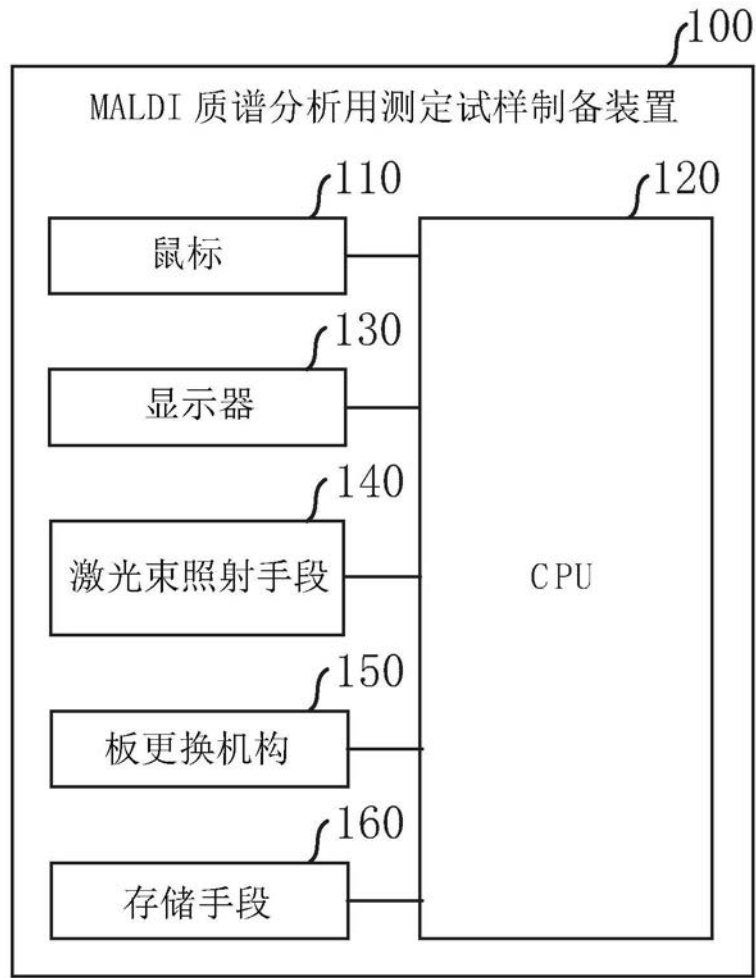


图3A

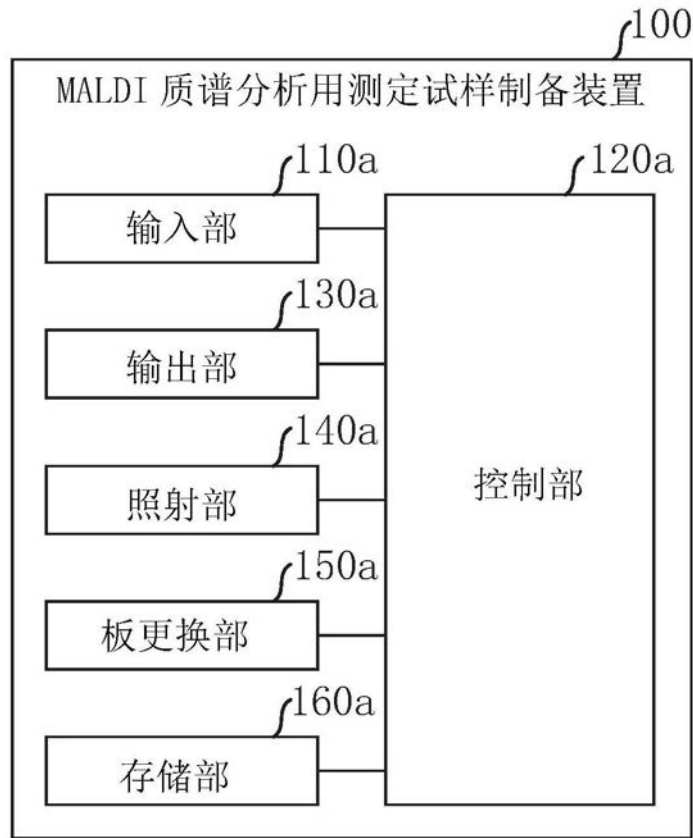


图3B

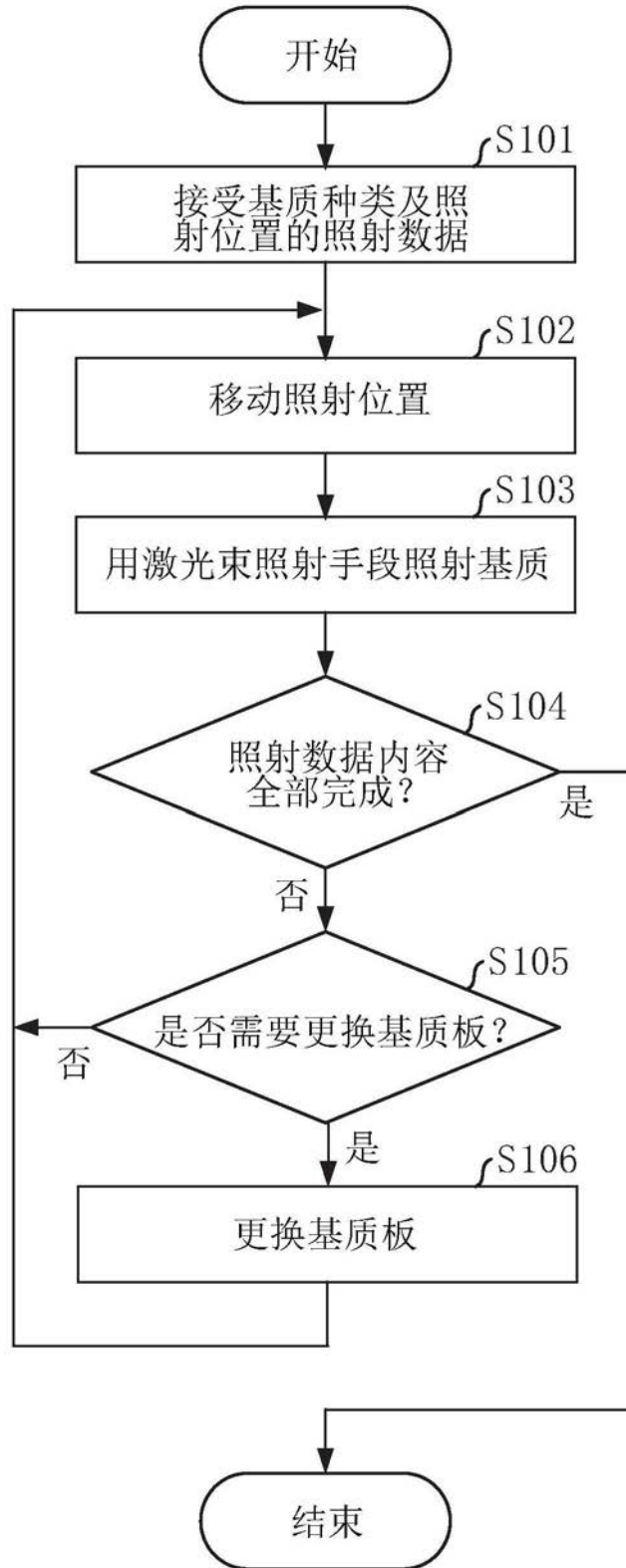


图3C



图4A

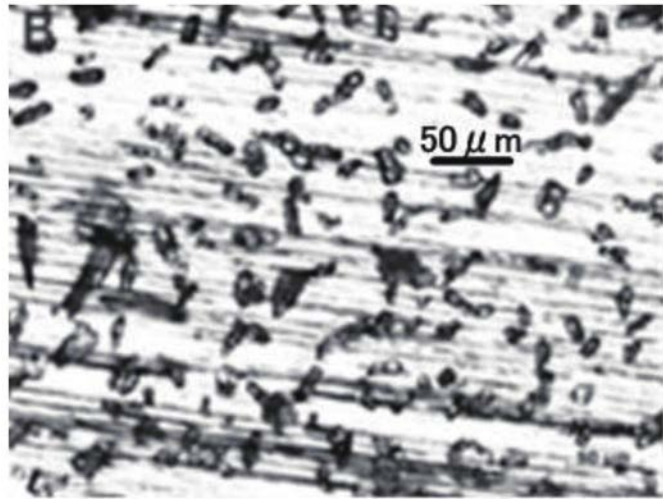


图4B

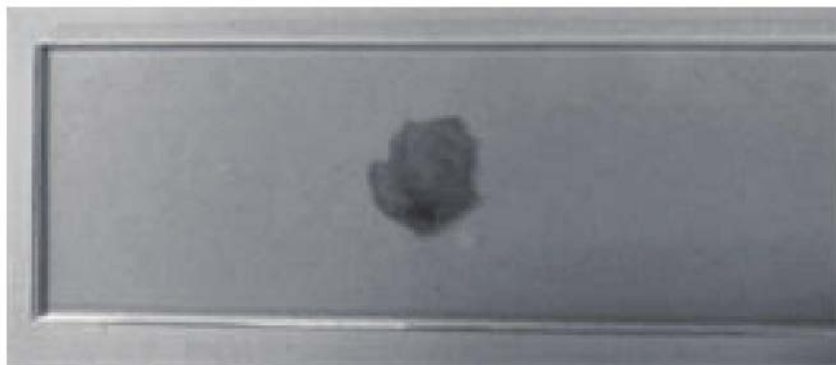


图5

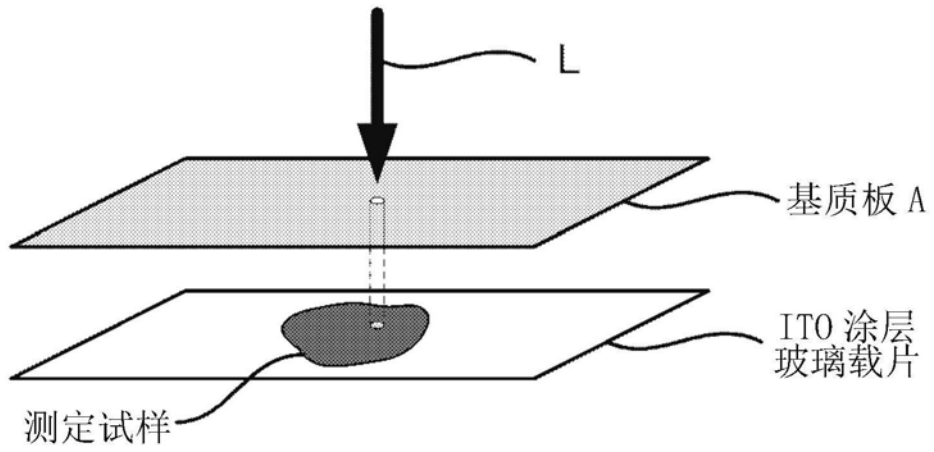


图6A

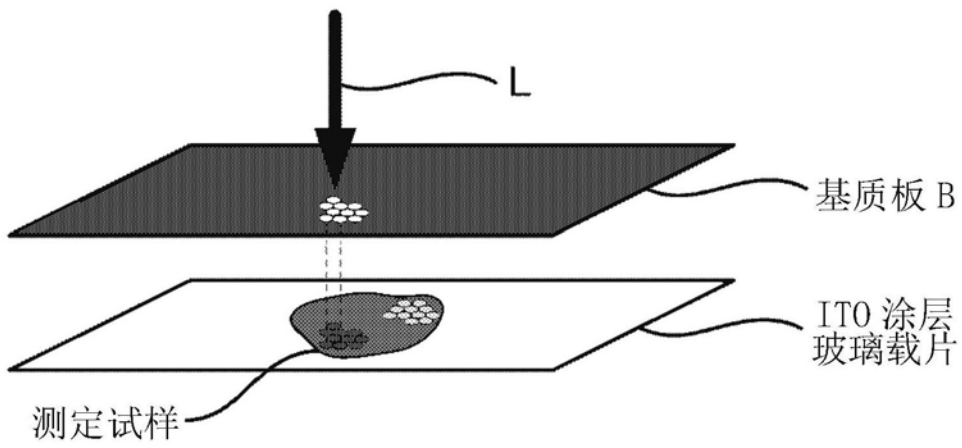


图6B

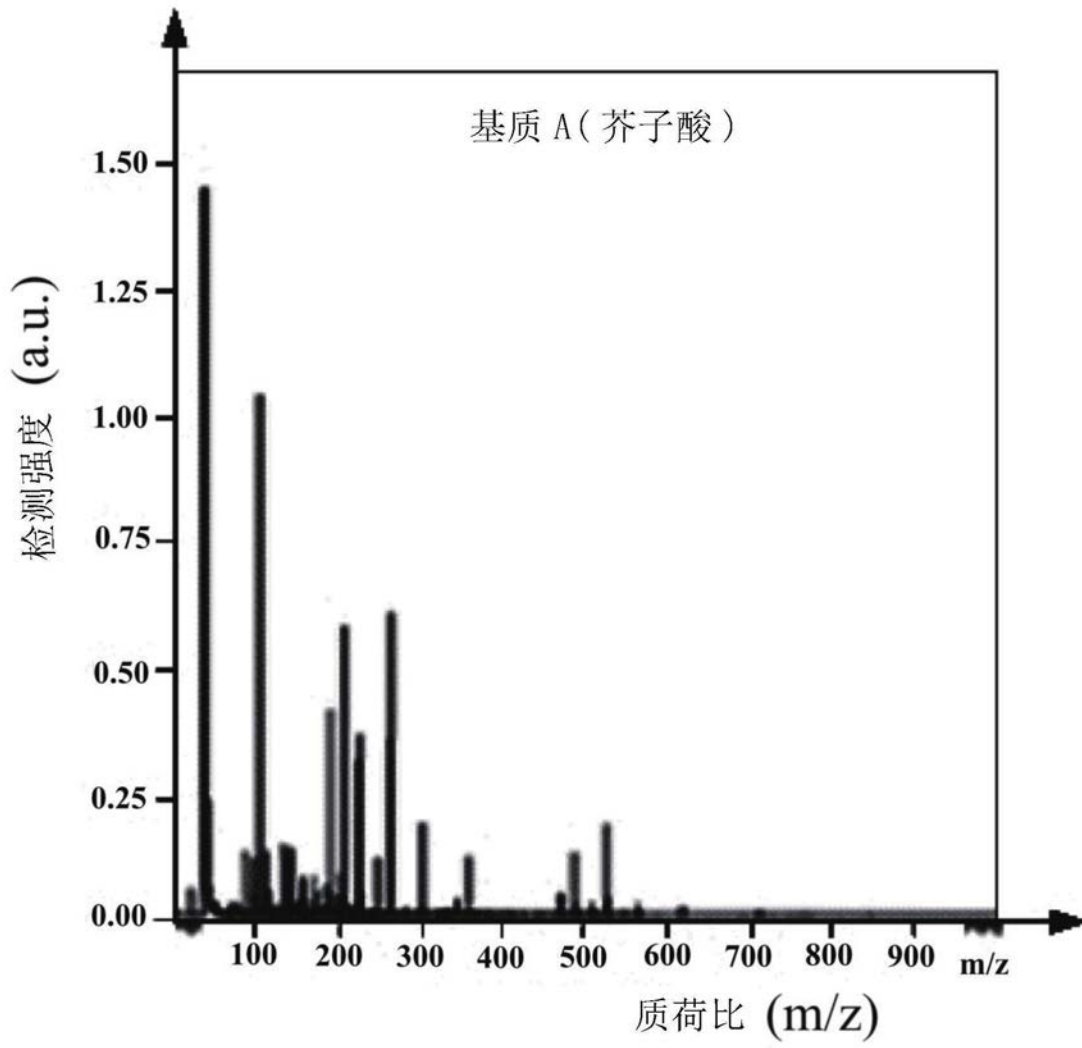


图7A

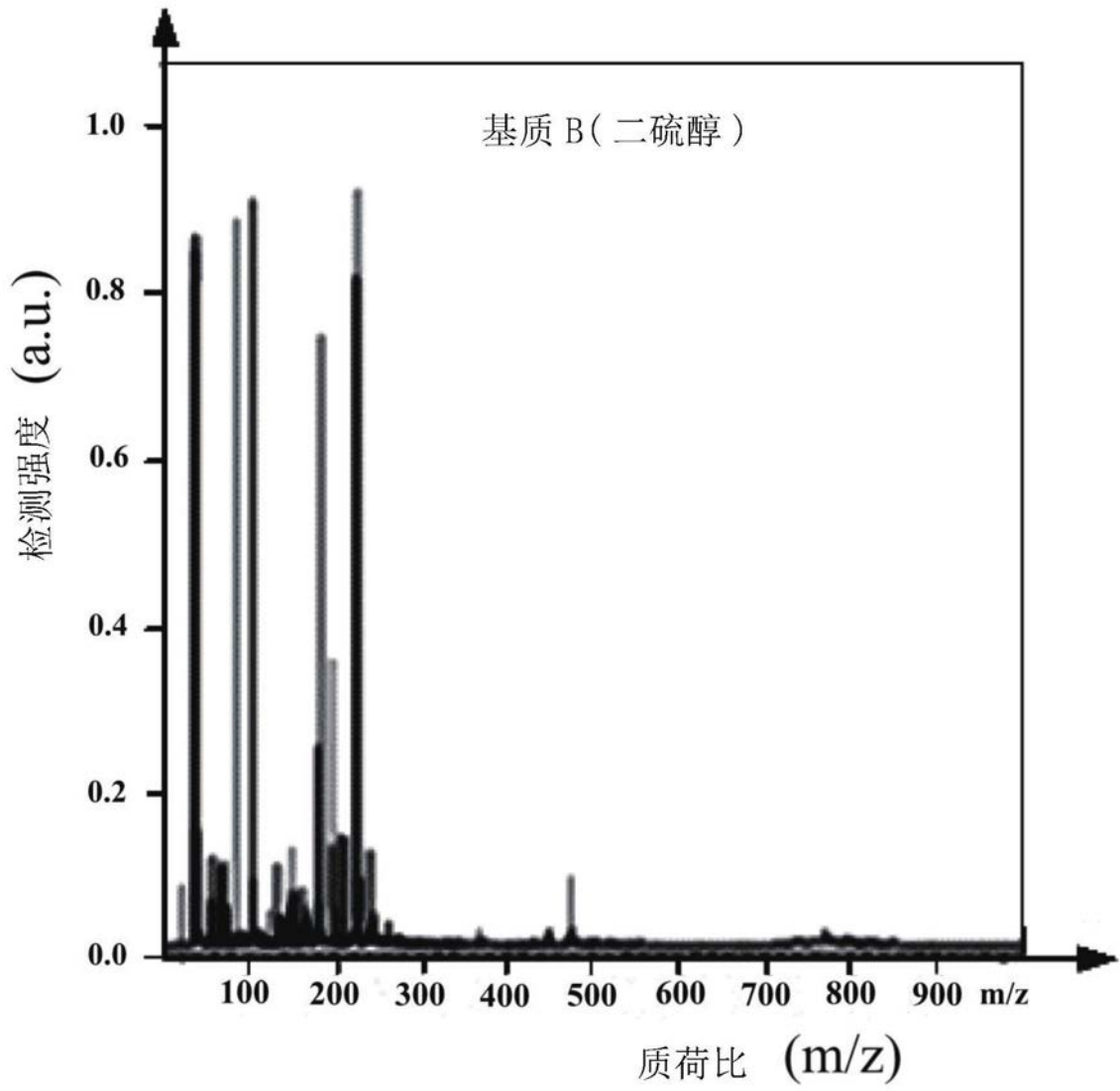


图7B

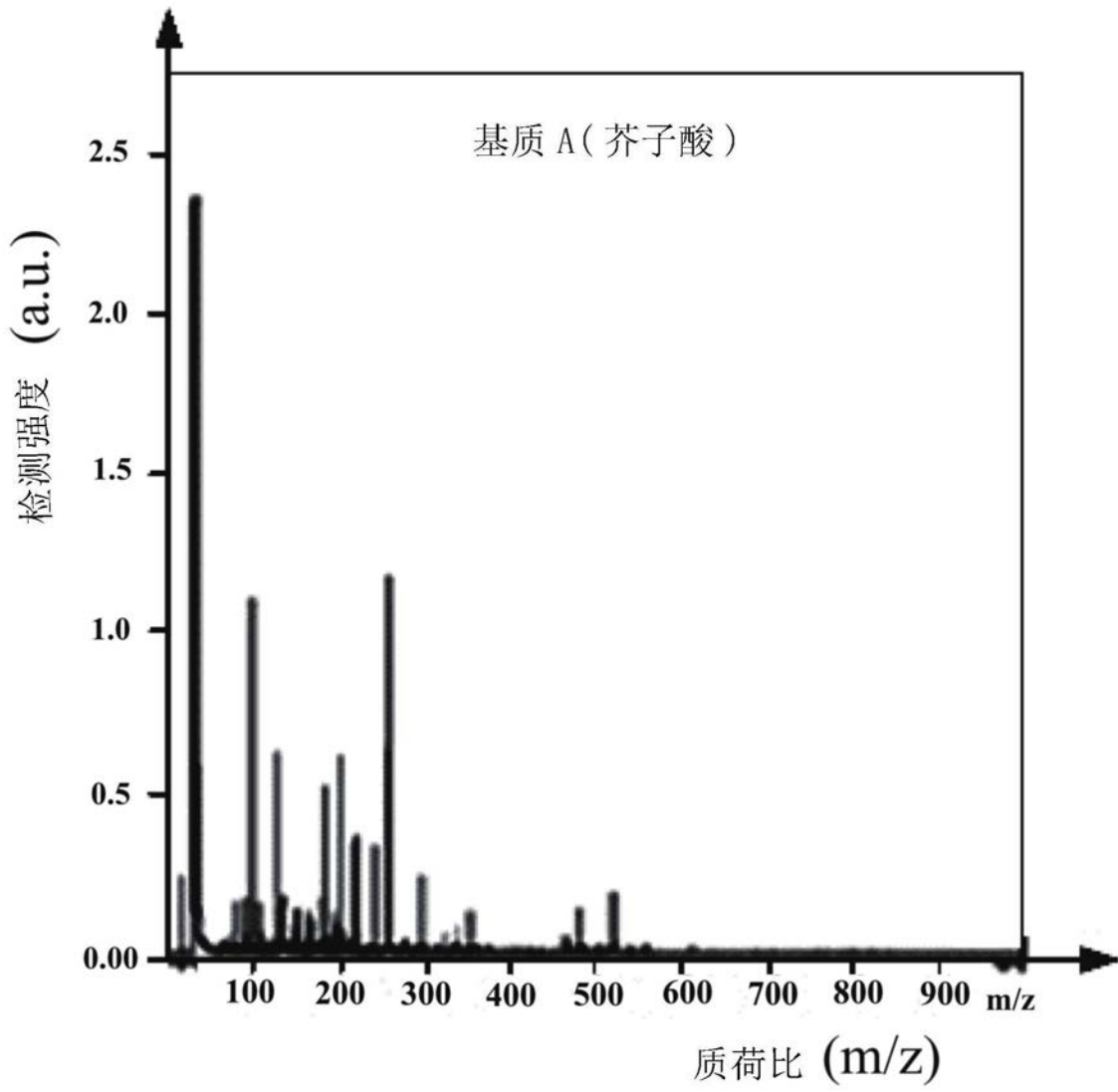


图8A

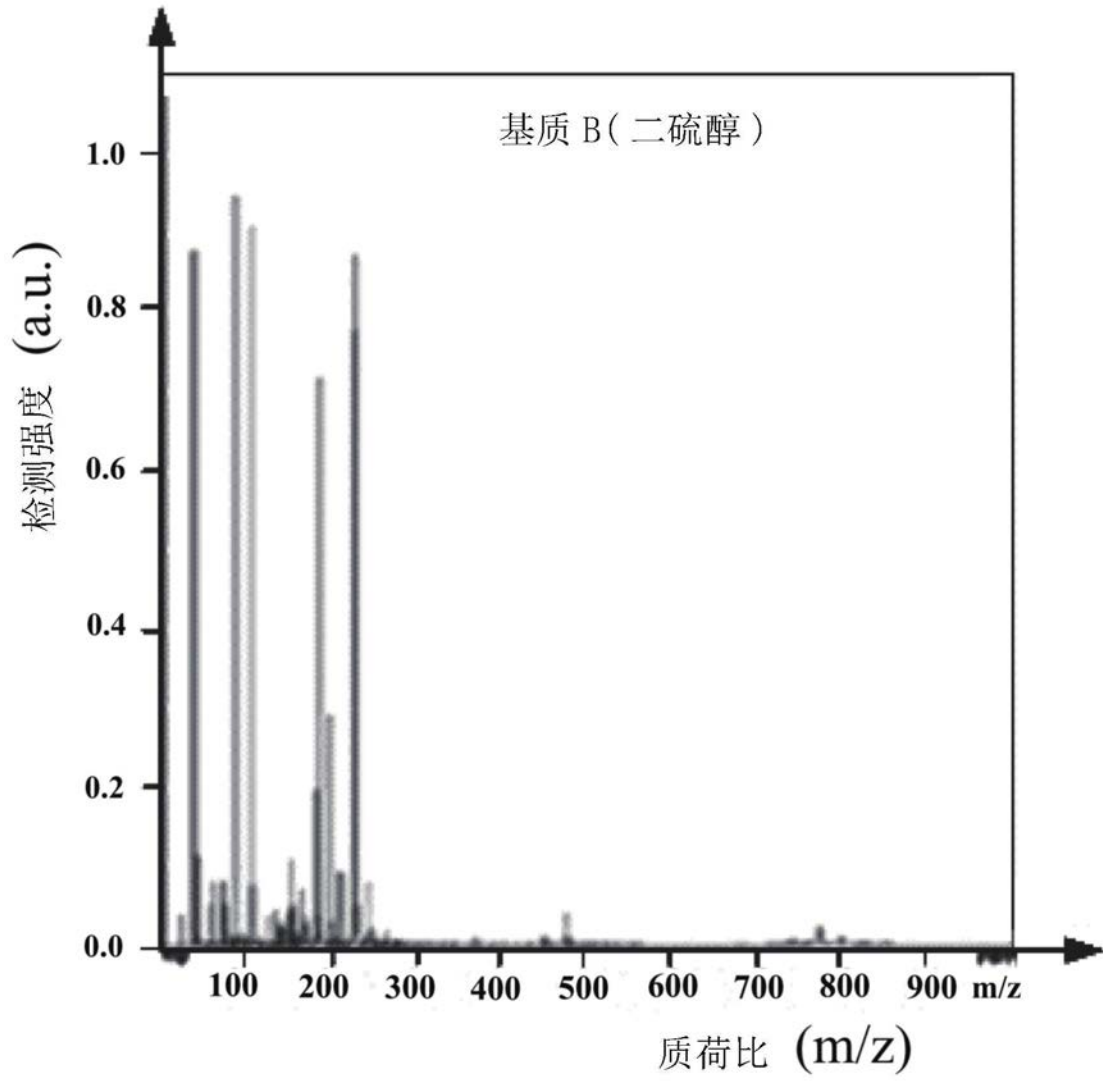


图8B



图9A

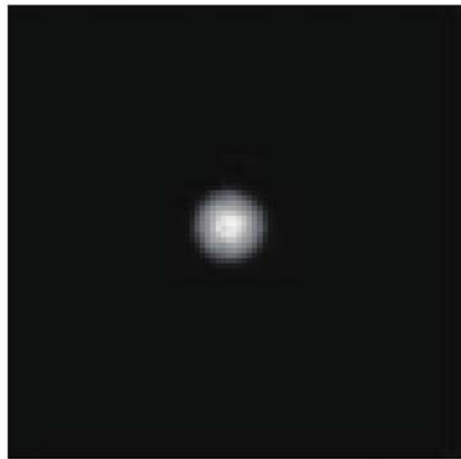


图9B



图9C



图10A

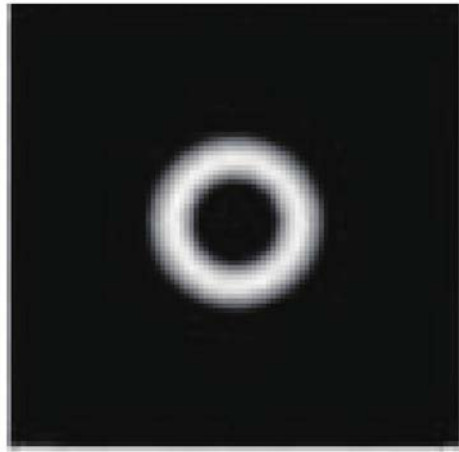


图10B

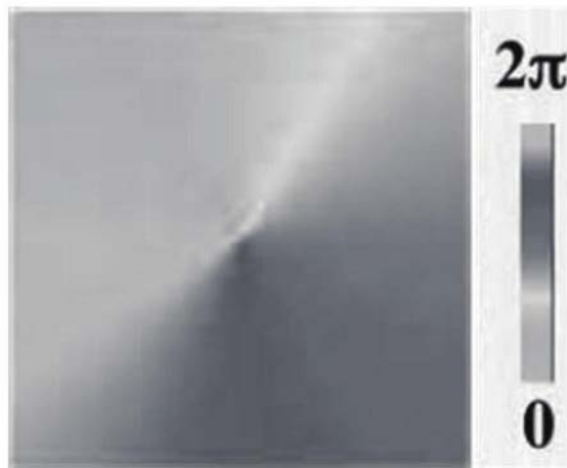


图10C

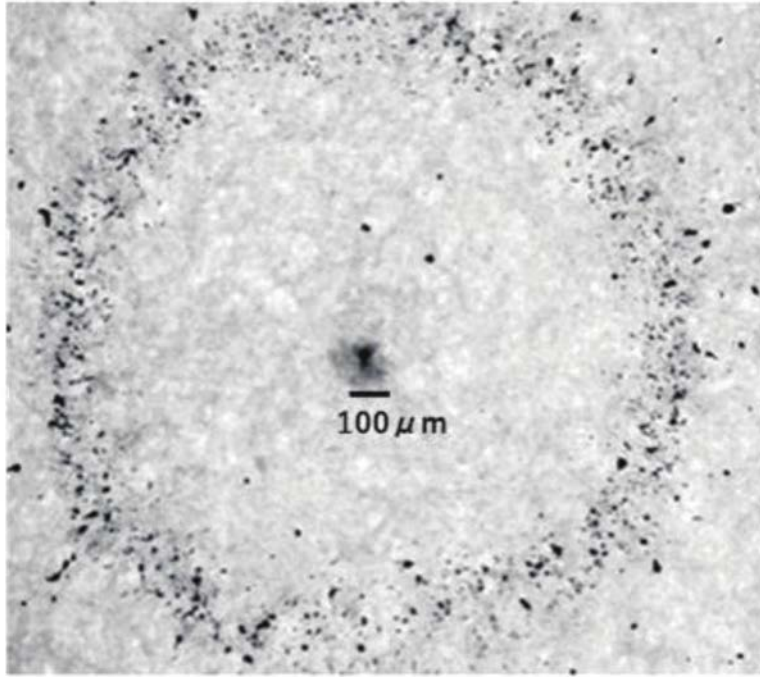


图11A

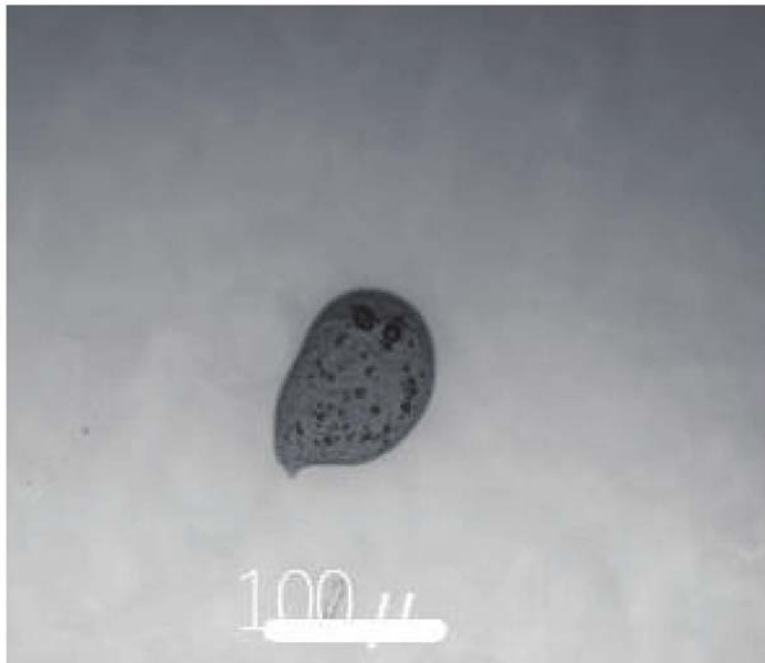


图11B

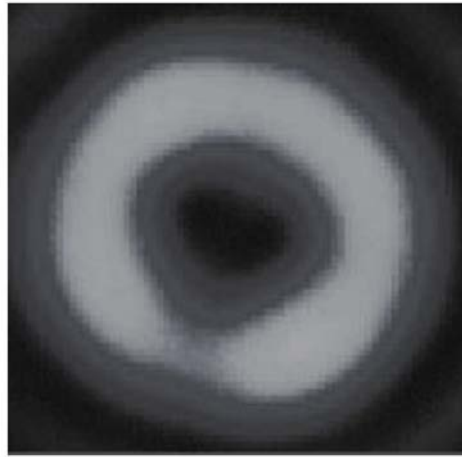


图12A

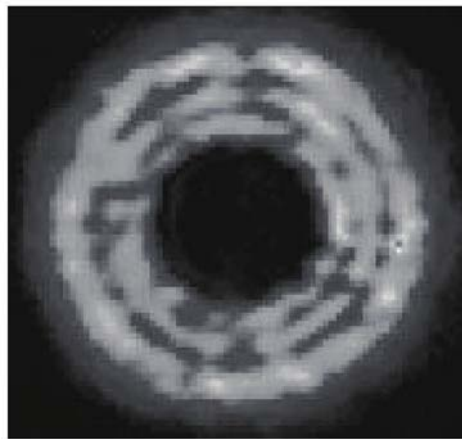


图12B

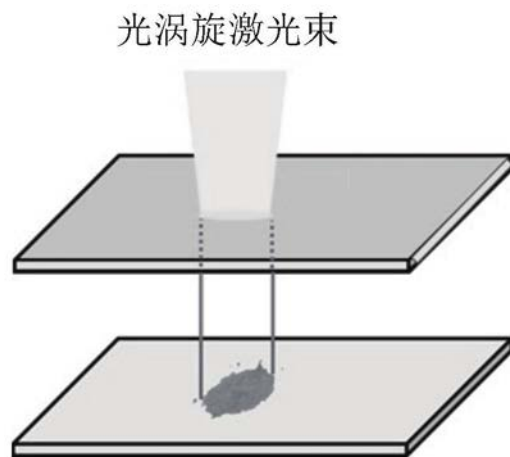


图13A



图13B

高斯激光束

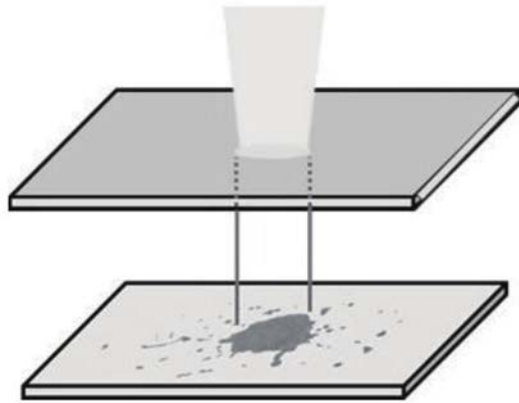


图14A

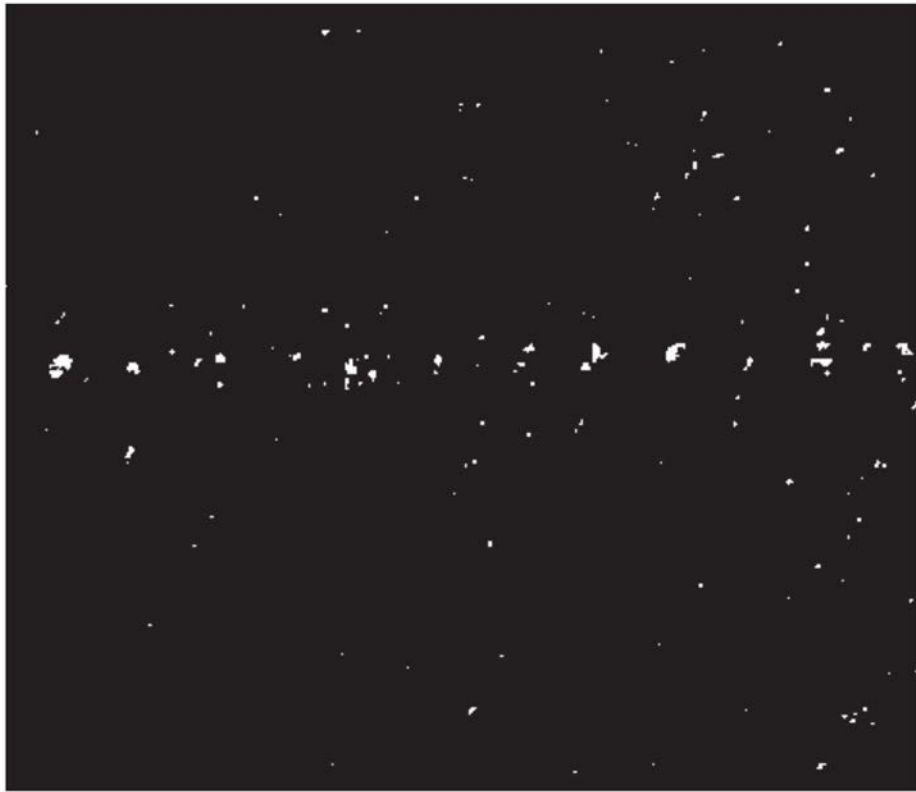


图14B



图15A

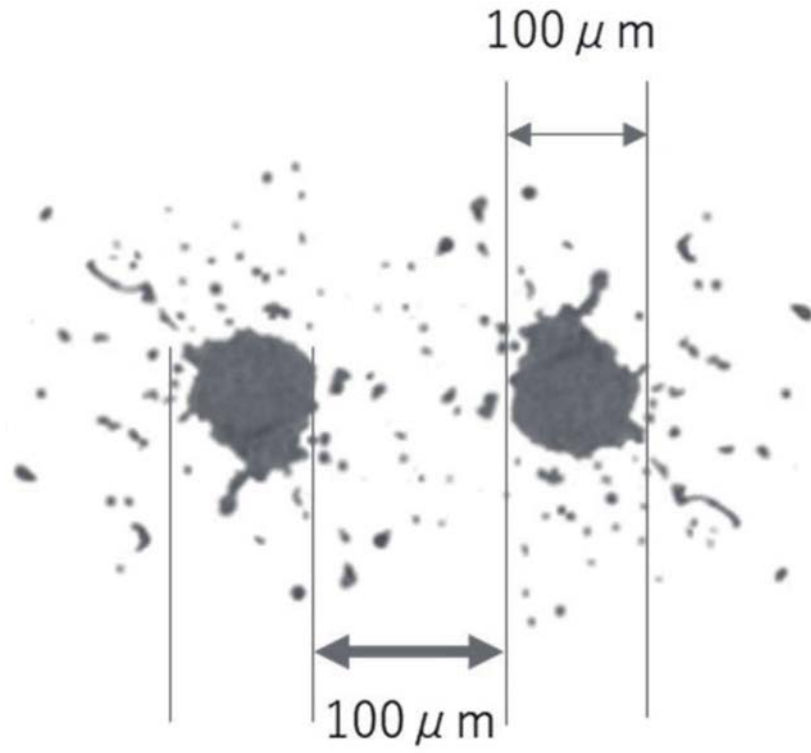


图15B