



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104849444 A

(43) 申请公布日 2015. 08. 19

(21) 申请号 201510259777. 4

G01N 15/14(2006. 01)

(22) 申请日 2015. 05. 20

(71) 申请人 大连海事大学

地址 116026 辽宁省大连市高新园区凌海路  
1号

(72) 发明人 王俊生 楚惠 潘新祥 孙野青  
李冬青

(74) 专利代理机构 大连东方专利代理有限责任  
公司 21212

代理人 贾汉生 李馨

(51) Int. Cl.

G01N 33/53(2006. 01)

G01N 21/64(2006. 01)

G01N 15/06(2006. 01)

权利要求书1页 说明书6页 附图2页

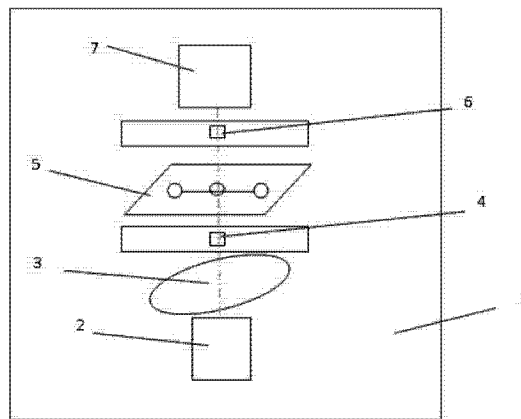
(54) 发明名称

荧光和遮挡同时测量的细胞计数装置及方法

(57) 摘要

本发明公开了荧光和遮挡同时测量的细胞计数装置,所述装置通过选择特定的 LED 光源和窄带滤光片,并通过调整光阑孔大小和滤光片角度调整光通量,可以同时测量生物细胞的荧光信号和聚苯乙烯微粒的遮挡信号,达到细胞计数、微粒计数和活性分析的目的。探测为单纯的光电检测,不与细胞直接接触,没有任何外加电场,没有高功率激光照射,完全真实的细胞培养环境,对细胞无损伤。本发明还公开了基于荧光和遮挡同时测量的细胞计数方法,可以同时检测到含荧光物质的细胞的脉冲信号和不含荧光物质的颗粒物脉冲信号;对特定脉冲方向的脉冲进行计数即可得出对应细胞和颗粒物的数量,可以计算出两者的比例。

该细胞计数方法方便、快捷。



1. 荧光和遮挡同时测量的细胞计数装置,其特征在于,所述装置包括平台(1)、微流控芯片(5)、光源(7)、滤光片(3)、光电探测器(2)、小孔光阑 I (6) 和小孔光阑 II (4);

所述平台(1)为暗室平台,光源(7)与平台(1)连接,微流控芯片(5)、滤光片(3)、光电探测器(2)、小孔光阑 I (6) 和小孔光阑 II (4) 固定在平台(1)内;

所述光源(7)、小孔光阑 I (6)、微流控芯片(5)、小孔光阑 II (4)、滤光片(3)、光电探测器(2)依次排列放置,且各部件的中心位于一条直线方向上。

2. 根据权利要求 1 所述的荧光和遮挡同时测量的细胞计数装置,其特征在于,所述小孔光阑 I (6) 和小孔光阑 II (4) 的光阑孔大小是可调的。

3. 根据权利要求 1 所述的荧光和遮挡同时测量的细胞计数装置,其特征在于,滤光片(3)可以倾斜放置,倾斜角度是可调的。

4. 利用权利要求 1-3 任意一项权利要求所述的荧光和遮挡同时测量的细胞计数装置的计数方法,其特征在于,所述方法包括如下步骤,

步骤一:根据待测样品中荧光物质的激发波长和发射波长确定光源(7)和滤光片(3)的波长;

所述待测样品为不含荧光物质的颗粒物或含荧光物质的细胞;

步骤二:调整小孔光阑 I (6) 和小孔光阑 II (4) 的光阑孔尺寸,调整滤光片(3)的倾斜角度;为了减少噪声,背景光越弱越好,但是为了提高荧光信号和遮挡信号幅值,激发光越强越好,所以需要找到一个合适的光强值,通过调整滤光片倾斜角度,改变滤光片透光率,提供合适的背景光和激发光;将待测样品加入微流控芯片(5),开启光源(7)、光电探测器(2),光源(7)发出的光线依次经小孔光阑 I (6)、微流控芯片(5)、小孔光阑 II (4) 和滤光片(3)入射到光电探测器(2);

所述待测样品在重力驱动下流经光电探测器(2)的检测区,在待测样品的垂直方向有光线通过,如果一个投影面积为 A 的颗粒通过微流控芯片(5)的微通道,光电探测器(2)的检测区光线遮挡,光电探测器(2)就会产生一个脉冲,脉冲的高度与颗粒粒径成正比;如果一个含荧光物质的细胞通过微通道,那么它受光源激发就会发出荧光,灵敏区光线增强,光电探测器(2)就会产生一个与光遮挡反方向的脉冲,脉冲的高度与细胞中荧光物质含量成正比;两者在光强变化上呈现两种截然相反的趋势,在曲线上分别显示为向上的脉冲和向下的脉冲;

步骤三:对两种方向的脉冲分别进行计数,可以分别得到不含荧光物质的颗粒物的数目和含荧光物质的细胞的数目,可以分析细胞浓度和颗粒浓度;通过统计脉冲的高度,可以分析微粒尺寸、细胞尺寸和细胞中荧光物质含量;通过荧光发光情况可以进一步的确定细胞的生存性。

## 荧光和遮挡同时测量的细胞计数装置及方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及细胞计数装置和方法,特别涉及荧光和遮挡同时测量的细胞计数装置和方法。

### 背景技术

[0002] 光遮挡,是利用微粒对光的遮挡所发生的光强度变化进行微粒粒径检测的方法,检测范围从  $1\ \mu\text{m}$  到  $2.5\text{mm}$ 。当液体中的微粒通过一窄小的检测区时,与液体流向垂直的入射光,由于被不溶性微粒所阻挡,从而使传感器输出信号变化。用光阻方法测量悬浮液中的颗粒,早在 1958 年由 Carve. L. D 发明的,经几十年的发展仍为人们关注的检测液体中颗粒数量和粒度分布的方法。此方法又称消光法或光蚀法。

[0003] 荧光检测技术是检测灵敏度最高的检测技术,常用的方式为激光诱导荧光,荧光标记物在受到特定频率的光线照射后,电子会吸收能量由基态跃迁至激发态,在电子无辐射跃迁回基态最低振动能级过程中伴随产生的能量释放现象即产生荧光。荧光检测器是检测灵敏度最高的检测器之一,常用的方式为激光诱导荧光。脉冲阻抗计数也称库尔特计数也是常用技术,两者结合可以测量各种颗粒或细胞的个数及发光情况,但是这两种技术也有自身难以克服的缺点:其一,激光诱导荧光设备体积大、功耗高、寿命短;其二,虽然激光光源单色性好,但是每个特定波长的激光器所发出的光谱为数个或单个离散峰值,不仅存在于荧光激发光谱不匹配的问题,而且需要经常更换激光光源,进一步增加了成本;其三,高功率的激光会产生很大的能量,光斑照射在细胞上难免会对其产生影响,其四,脉冲阻抗计数需要提供额外的电路,在微流控芯片中形成电渗流,而电渗流对细胞的损伤科学界尚未得出定论,但是一直为人所诟病,而且长时间加电会使微流控芯片 PBS 缓冲液产生化学变化,产生的絮状物将减慢流速毒害细胞,妨碍长时间观测。

[0004] 制作微流控芯片的常用材料包括单晶硅、石英、玻璃和高分子聚合物等。其中,PDMS 芯片拥有良好的弹性,可以更好地与外界部件进行整合。PDMS 芯片应用在某些生物实验中,可以形成足够稳定的温度梯度,便于反应的实现。PDMS 芯片拥有无毒特征以及透气性,对可见光与紫外光的穿透性,可与多种光学检测器实现联用,易于成形,工艺简单,可批量生产,成本低,拥有更好的稳定性和绝缘性等优点。

### 发明内容

[0005] 本发明解决的技术问题是提供可对含荧光物质的细胞和不含荧光物质的颗粒物进行同时检测和计数的装置及方法,所述装置成本低、体积小、检测灵敏度高、对细胞无损伤,所述方法可得到不含荧光物质的颗粒物的尺寸、含荧光物质的细胞中荧光物质含量、以及含荧光物质的细胞和不含荧光物质的颗粒物的数量。

[0006] 本发明提供一种荧光和遮挡同时测量的细胞计数装置,所述装置包括平台、微流控芯片、光源、滤光片、光电探测器、小孔光阑 I 和小孔光阑 II;所述平台为暗室平台,光源与平台连接,微流控芯片、滤光片、光电探测器、小孔光阑 I 和小孔光阑 II 固定在平台内;所

述光源、小孔光阑 I、微流控芯片、小孔光阑 II、滤光片、光电探测器依次排列放置,且各部件的中心位于一条直线方向上。

[0007] 所述装置移除现有设备中常见的安置在光源和小孔光阑 I 之间用来减少背景噪声的滤光片。

[0008] 所述光源优选为发光二极管(LED)。

[0009] 所述滤光片的倾斜角度可调,倾斜角度优选为  $0^{\circ}$  - $15^{\circ}$ 。为了减少噪声,背景光越弱越好,但是为了提高荧光信号和遮挡信号幅值,激发光越强越好,所以需要找到一个合适的光强值。通过调整滤光片倾斜角度,改变滤光片透光率,提供合适的背景光和激发光。而且,通过调整角度可以让背景光透过一部分,达到为遮挡法提供光线的目的。所述滤光片优选为窄带滤光片。

[0010] 所述光电探测器优选为硅光电二极管,进一步优选为范围为可见光波长的高灵敏度硅光电二极管。

[0011] 本发明中,对光电探测器检测到的信号采用移相差分电路进行放大;结果经数据采集卡送入 LABVIEW 以波形的方式显示在电脑屏幕上。

[0012] 所述微流控芯片优选为 PDMS 芯片,所述 PDMS 芯片可利用文献《聚二甲基硅氧烷微流体芯片的制作技术》(刘长春,崔大付,王利;传感器技术;2004 年 07 期)所述方法进行制作。

[0013] 所述小孔光阑 I 和小孔光阑 II 由可遮挡可见光的材料制成,光阑孔位于小孔光阑的中心位置。

[0014] 所述小孔光阑的材料优选为光掩膜,进一步优选为铬版光掩膜。光掩膜通常分为两个区:透光区和遮光区,透光区能很好地透光,并且对光的吸收小;遮光区能够很好地阻挡各类光线的通过,本发明利用光掩膜的遮光和透光的特性制作小孔光阑。

[0015] 所述小孔光阑 I 和小孔光阑 II 的光阑孔大小是可调的。

[0016] 所述小孔光阑 I 用于限制照射到微流控芯片上的背景光光量,小孔光阑 II 用于限制光电检测器件的进光量;所述小孔光阑 I 和小孔光阑 II 的光阑孔大小可以根据待测物的不同尺寸进行调整、组合,达到最佳检测效果。两个小孔光阑也起到准直作用。其中,所述小孔光阑 II 的光阑孔大小约等于检测区域时检测效果最佳。本领域所属技术人员可根据现有光学知识确定调整、组合方式。例如,如果待测物尺寸小,减小小孔光阑 II 能提高检测精度;如果待测物尺寸大,增大小孔光阑 II 的尺寸能提高检测精度,同时注意改变小孔光阑 I,使其适合荧光信号的检测。

[0017] 优选地,所述小孔光阑 I 的光阑孔直径为  $400\ \mu\text{m}$ ;小孔光阑 II 的光阑孔直径为  $100\ \mu\text{m}$ 。

[0018] 本发明还提供一种荧光和遮挡同时测量的细胞计数方法,所述方法利用上述荧光和遮挡同时测量的细胞计数装置实现,所述方法包括如下步骤,

[0019] 步骤一:根据待测样品中荧光物质的激发波长和发射波长确定光源和滤光片的波长;

[0020] 所述待测样品为不含荧光物质的颗粒物或含荧光物质的细胞;

[0021] 步骤二:调整小孔光阑 I 和小孔光阑 II 的光阑孔尺寸,调整滤光片的倾斜角度;为了减少噪声,背景光越弱越好,但是为了提高荧光信号和遮挡信号幅值,激发光越强越

好,所以需要找到一个合适的光强值,通过调整滤光片倾斜角度,改变滤光片透光率,提供合适的背景光和激发光;将待测样品加入微流控芯片,开启光源、光电探测器,光源发出的光线依次经小孔光阑 I、微流控芯片、小孔光阑 II 和滤光片入射到光电探测器;

[0022] 所述待测样品在重力驱动下流经光电探测器的检测区,在待测样品的垂直方向有光线通过,如果一个投影面积为 A 的颗粒通过微流控芯片的微通道,光电探测器的检测区光线遮挡,光电探测器就会产生一个脉冲,脉冲的高度与颗粒粒径成正比;如果一个含荧光物质的细胞通过微通道,那么它受光源激发就会发出荧光,灵敏区光线增强,光电探测器就会产生一个与光遮挡反方向的脉冲,脉冲的高度与细胞中荧光物质含量成正比;两者在光强变化上呈现两种截然相反的趋势,在曲线上分别显示为向上的脉冲和向下的脉冲;

[0023] 步骤三:对两种方向的脉冲分别进行计数,可以分别得到不含荧光物质的颗粒物的数目和含荧光物质的细胞的数目,可以分析细胞浓度和颗粒浓度;通过统计脉冲的高度,可以分析微粒尺寸、细胞尺寸和细胞中荧光物质含量;通过荧光发光情况可以进一步的确定细胞的生存性。

[0024] 所述荧光物质为经光源照射会发出荧光的物质;所述荧光物质的来源为所述细胞自身具有的物质,或所述细胞自身不具有,利用荧光素标记后产生的物质。

[0025] 所述装置的光源和滤光片依据待测样品中荧光物质的激发波长和发射波长进行选择,使光源的中心波长集中在荧光物质的激发波长,滤光片的中心波长集中在荧光物质的发射波长。通过组合不同光源和滤光片可以检测不同待测物。例如,富含叶绿素的海藻细胞,当一个叶绿素分子 a 的电子从激发态回到基态的过程中,一小部分激发能以红色荧光形式散耗,用流式细胞仪检测它的激发波长和发射波长分别为 480nm 和 680nm,相应地,选择中心波长为 480nm 的 LED 作为光源,中心波长为 680nm、带宽为 30nm 的滤光片;PI 荧光染料 PI(碘化丙啶)是一种可对 DNA 染色的细胞核染色试剂,它是一种溴化乙啶的类似物,在嵌入双链 DNA 后释放红色荧光,PI 不能通过活细胞膜,但却能穿过破损的细胞膜而对核染色,用流式细胞仪检测它的激发波长和发射波长分别为 535nm 和 615nm,相应地,选择中心波长为 535nm 的 LED 作为光源,中心波长为 615nm、带宽为 30nm 的滤光片;FITC(异硫氰酸荧光素)是检测组织细胞内蛋白质最常用的荧光探针,用流式细胞仪检测它的激发波长为 480nm,发射波长为 530nm,相应地,选择中心波长为 480nm 的 LED 作为光源,中心波长为 530nm、带宽为 30nm 的滤光片。

[0026] 本发明荧光和遮挡同时测量的细胞计数装置可用于免疫荧光分析中。

[0027] 免疫荧光分析是将不影响抗原、抗体活性的荧光素标记在抗原或抗体上,荧光素与其相应的抗原或抗体结合后将产生荧光物质。例如,经特定光源照射后,癌变细胞的抗体染色后会发出荧光,未癌变的细胞则不会,根据癌细胞内蛋白质的不同,显示出不同的荧光色;PI 染色淋巴细胞,死细胞会被染色经特定光源照射后激发出荧光,活细胞则不会。通过检测含荧光物质的细胞和不含荧光物质的细胞的脉冲信号可以达到区分两种特性细胞的目的。

[0028] 本发明还可应用于临床诊断、环境检测及生物检测等领域,在基因分析、免疫分析、单细胞分析、药物分析、临床检测、环境监控等诸多领域具有广阔的应用前景。

[0029] 本发明有益效果为:

[0030] 本发明荧光和遮挡同时测量的细胞计数装置相比,成本更低、试剂和样品消耗量

少、体积更小、分析时间短、检测灵敏度高；微流控芯片与电路不直接连接，抗抖动干扰能力更强。本发明所述荧光和遮挡同时测量的细胞计数装置采用 PDMS 芯片可满足装置需求，得到理想的检测结果。

[0031] 本发明的装置为单纯的光电检测，不与细胞直接接触，没有任何外加电场，没有高功率激光照射，完全真实的细胞培养环境，对细胞无损伤，可使微流控技术与生物技术更好地结合。

[0032] 本发明荧光和遮挡同时测量的细胞计数装置及方法，可以同时检测到含荧光物质的细胞的脉冲信号和不含荧光物质的颗粒物的脉冲信号；通过两者的脉冲方向即可归属脉冲信号所属细胞含或不含荧光物质；对特定脉冲方向的脉冲进行计数即可得出对应细胞数，可以计算出两种细胞的比例。该细胞计数方法方便、快捷。

### 附图说明

[0033] 本发明附图 4 幅，

[0034] 图 1 为本发明荧光和遮挡同时测量的细胞计数装置结构示意图；

[0035] 附图标记说明：1、平台，2、光电探测器，3、滤光片，4、小孔光阑 II，5、微流控芯片，6、小孔光阑 I，7、光源。

[0036] 图 2 为实施例 2 中扁藻细胞检测结果，荧光信号曲线显示为向下脉冲。

[0037] 图 3 为实施例 3 中聚苯乙烯颗粒检测结果，遮挡信号曲线显示为向上脉冲。

[0038] 图 4 为实施例 4 中扁藻细胞和聚苯乙烯颗粒的混合溶液检测结果，既有荧光信号又有遮挡信号，显示为既有向上脉冲又有向下脉冲。

### 具体实施方式

[0039] 下面结合下述实施例对本发明做进一步说明，下述实施例不以任何方式限制本发明。

[0040] 实施例 1

[0041] 荧光和遮挡同时测量的细胞计数装置，如图 1 所示，所述装置的光源 7、小孔光阑 I 6、微流控芯片 5、小孔光阑 II 4、滤光片 3、光电探测器 2 依次排列放置，且各部件的中心位于一条直线方向上。

[0042] 所述平台 1 为暗室平台，光源 7 与平台 1 连接，微流控芯片 5、光电探测器 2、小孔光阑 I 6、小孔光阑 II 4 和滤光片 3 固定在平台 1 内；

[0043] 其中，光源 7 为发光二极管 (LED)；微流控芯片 5 为 PDMS 芯片，利用文献《聚二甲基硅氧烷微流体芯片的制作技术》(刘长春，崔大付，王利；传感器技术；2004 年 07 期)所述方法制作成；滤光片 3 为窄带滤光片，倾斜角度可调；光电探测器 2 为可见光波长的硅光电二极管；小孔光阑 I 6 和小孔光阑 II 4 使用黑色掩膜材料制成，光阑孔位于小孔光阑的中心位置，小孔光阑 I 6 的光阑孔直径为  $400\ \mu\text{m}$ ；小孔光阑 II 4 的光阑孔直径为  $100\ \mu\text{m}$ 。

[0044] 实施例 2

[0045] 利用实施例 1 所述荧光和遮挡同时测量的细胞计数装置对待测样品扁藻细胞进行检测，检测结果如图 2 所示。其中，扁藻细胞样品的浓度为  $1 \times 10^3\ \text{cell/ml}$ 、长度约为  $15\ \mu\text{m}$ 。

[0046] 荧光和遮挡同时测量的细胞计数方法包括如下步骤,

[0047] 步骤一:利用流式细胞仪测出本实施例中扁藻细胞样品的激发波长和发射波长分别为 480nm 和 680nm,选择中心波长 480nm 的发光二极管作为光源、选择中心波长 680nm、带宽 30nm 的窄带滤光片,滤光片的倾斜角度为  $5^{\circ}$  ;

[0048] 步骤二:将扁藻细胞样品滴加加入微流控芯片 5,开启光源 7、光电探测器 2,光源 7 发出的光线依次经小孔光阑 I 6、微流控芯片 5、小孔光阑 II 4 和滤光片 3 入射到光电探测器 2,调整小孔光阑 I 6 的光阑孔直径为  $400\ \mu\text{m}$ 、小孔光阑 II 4 的光阑孔直径为  $100\ \mu\text{m}$ ,以得到较好的检测效果;

[0049] 在常温条件下,扁藻细胞样品流经微流控芯片检测区域,扁藻细胞样品中的荧光物质受到光源激发会发出荧光入射到光电探测器 2,对光电探测器 2 检测到的信号采用移相差分电路进行放大,结果经数据采集卡送入 LABVIEW 以波形的方式显示在电脑屏幕上。如图 2 所示,光电探测器产生向下脉冲;

[0050] 步骤三:对向下脉冲进行计数,可以得到扁藻细胞的数目。

[0051] 对相应的流经微流控芯片检测区域的扁藻细胞在显微镜下进行计数,与本实施例上述结果相符,证明了本发明所述方法和装置的正确性。

[0052] 实施例 3

[0053] 利用实施例 1 所述荧光和遮挡同时测量的细胞计数装置对待测样品聚苯乙烯颗粒进行检测,检测结果如图 3 所示。其中,聚苯乙烯颗粒的浓度为  $1 \times 10^3\ \text{cell/ml}$ 、直径为  $10\ \mu\text{m}$ 。

[0054] 荧光和遮挡同时测量的细胞计数方法包括如下步骤,

[0055] 步骤一:本实施例中聚苯乙烯颗粒样品不含荧光物质,选择中心波长 480nm 的发光二极管作为光源,选择中心波长 680nm 带宽 30nm 的窄带滤光片作为滤光片,滤光片的倾斜角度为  $5^{\circ}$  ;

[0056] 步骤二:将聚苯乙烯颗粒样品滴加加入微流控芯片 5,开启光源 7、光电探测器 2,光源 7 发出的光线依次经小孔光阑 I 6、微流控芯片 5、小孔光阑 II 4 和滤光片 3 入射到光电探测器 2,调整小孔光阑 I 6 的光阑孔直径为  $400\ \mu\text{m}$ 、小孔光阑 II 4 的光阑孔直径为  $100\ \mu\text{m}$ ,以得到较好的检测效果;

[0057] 在常温条件下,聚苯乙烯颗粒样品流经微流控芯片检测区域,聚苯乙烯颗粒样品遮住光源提供的部分背景光,对光电探测器 2 检测到的信号采用移相差分电路进行放大,结果经数据采集卡送入 LABVIEW 以波形的方式显示在电脑屏幕上。如图 3 所示,光电探测器产生向上脉冲;

[0058] 步骤三:对向上脉冲进行计数,可以得到聚苯乙烯颗粒的数目。

[0059] 对相应的流经微流控芯片检测区域的聚苯乙烯颗粒在显微镜下进行计数,与本实施例上述结果相符,证明了本发明所述方法和装置的正确性。

[0060] 实施例 4

[0061] 利用实施例 1 所述荧光和遮挡同时测量的细胞计数装置对待测样品扁藻细胞和聚苯乙烯颗粒的混合溶液进行检测,检测结果如图 4 所示。其中,扁藻细胞的浓度为  $1 \times 10^3\ \text{cell/ml}$ 、长度约为  $15\ \mu\text{m}$ ,聚苯乙烯颗粒的浓度为  $1 \times 10^3\ \text{cell/ml}$ 、直径为  $10\ \mu\text{m}$ 。

[0062] 荧光和遮挡同时测量的细胞计数方法包括如下步骤,

[0063] 步骤一：利用流式细胞仪测出本实施例中扁藻细胞的激发波长和发射波长分别为480nm和680nm，聚苯乙烯颗粒不含荧光物质；选择中心波长480nm的发光二极管作为光源，选择中心波长680nm带宽30nm的窄带滤光片作为滤光片，滤光片的倾斜角度为 $5^{\circ}$ ；

[0064] 步骤二：将扁藻细胞和聚苯乙烯颗粒的混合溶液滴加加入微流控芯片5，开启光源7、光电探测器2，光源7发出的光线依次经小孔光阑I 6、微流控芯片5、小孔光阑II 4和滤光片3入射到光电探测器2，调整小孔光阑I 6的光阑孔直径为 $400\ \mu\text{m}$ 、小孔光阑II 4的光阑孔直径为 $100\ \mu\text{m}$ ，以得到较好的检测效果；

[0065] 在常温条件下，扁藻细胞和聚苯乙烯颗粒的混合溶液流经微流控芯片检测区域，扁藻细胞中的荧光物质受到光源激发会发出荧光入射到光电探测器2，聚苯乙烯颗粒遮住光源提供的部分背景光，对光电探测器2检测到的信号采用移相差分电路进行放大，结果经数据采集卡送入LABVIEW以波形的方式显示在电脑屏幕上。如图4所示，光电探测器产生向下和向上脉冲；

[0066] 步骤三：对向下和向上脉冲进行计数，通过计算两种脉冲的个数，可以得到扁藻细胞和聚苯乙烯颗粒的数目的比例。

[0067] 对相应的流经微流控芯片检测区域的扁藻细胞和聚苯乙烯颗粒在显微镜下进行计数，与本实施例上述结果相符，证明了本发明所述方法和装置的正确性。



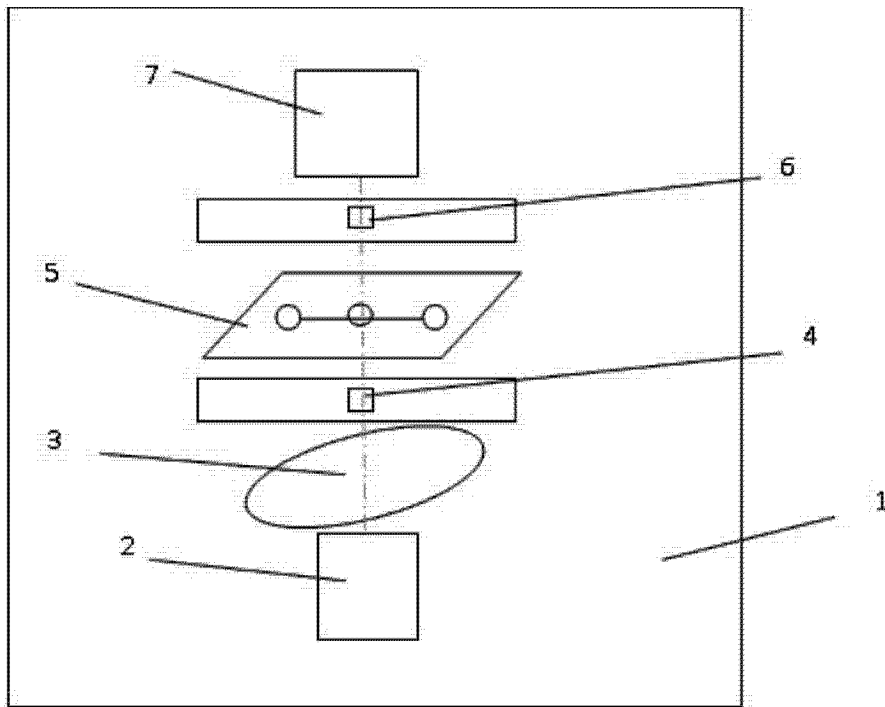


图 1

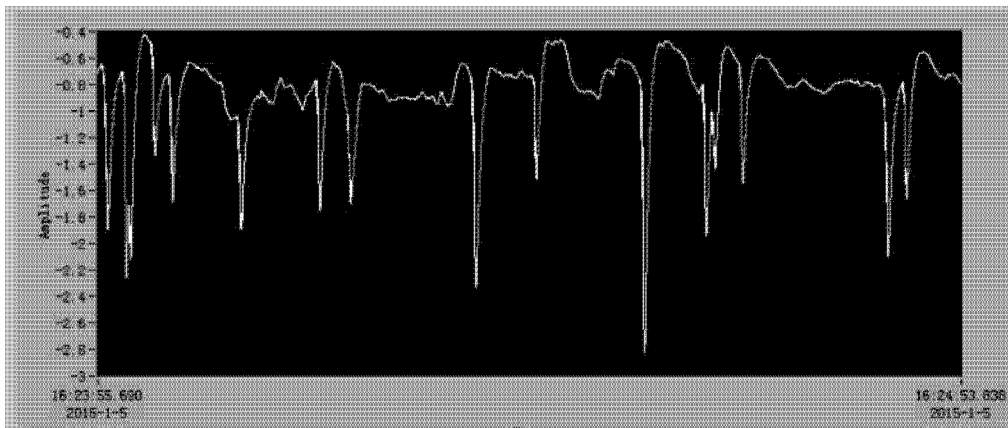


图 2

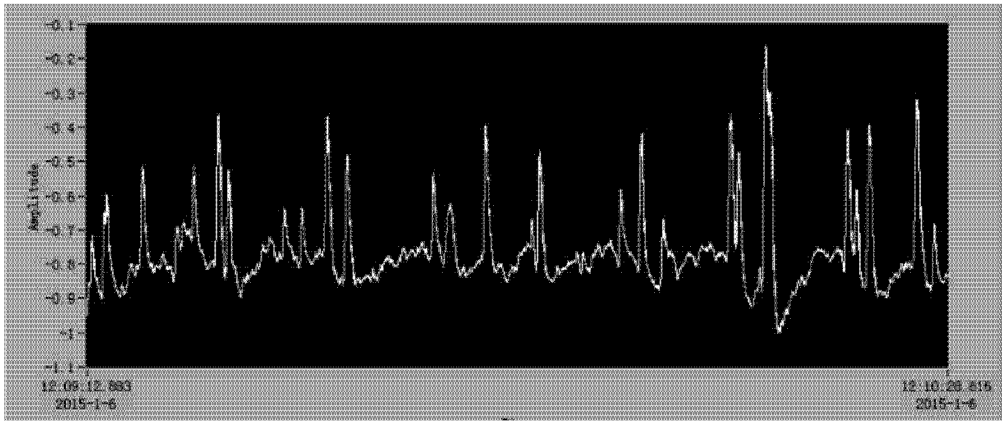


图 3

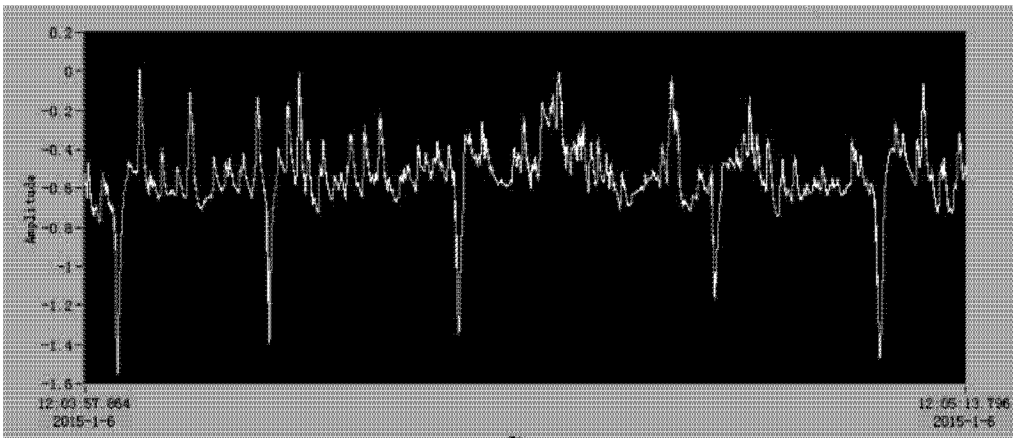


图 4