



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105331525 B

(45)授权公告日 2018.02.13

(21)申请号 201410404610.8

(22)申请日 2014.08.15

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 105331525 A

(43)申请公布日 2016.02.17

(73)专利权人 冠研(上海)专利技术有限公司
地址 200030 上海市徐汇区桂箐路7号3号
楼5楼

(72)发明人 钟挺豪 吕秋莹 林旻仪 官振群

(74)专利代理机构 上海申新律师事务所 31272
代理人 吴俊

(51)Int.Cl.
C12N 15/10(2006.01)

(56)对比文件

CN 201648403 U,2010.11.24,
CN 101722071 A,2010.06.09,
WO 2014035986 A1,2014.03.06,
CN 203663494 U,2014.06.25,

审查员 刘宝

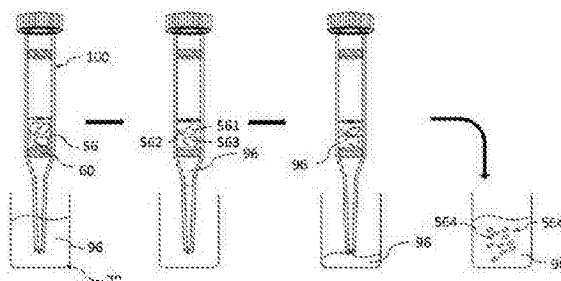
权利要求书1页 说明书14页 附图12页

(54)发明名称

生物样本的核酸产物萃取方法

(57)摘要

本发明公开了一种生物样本的核酸产物萃取方法,包含:提供一生物样本处理装置,包含管柱,具有第一及第二管体部,管柱为中空且两端开放,使管柱内形成流道,且第一管体部之一开放端缘形成第一开口,第二管体部之一开放端缘形成第二开口,其中,管柱之内径沿一轴向方向自第一开口向第二开口逐渐缩减,使第一管体部之平均内径大于第二管体部之平均内径,以及托座,且托座具有复数通孔;提供一固态生物样本,放置于托座上;提供一裂解液试剂,使的裂解液试剂通过第二管体部之第二开口并通过托座上的该些通孔进入第一管体部中,以取得一核酸产物。本发明生物样本的核酸产物萃取方法适用于自动化核酸萃取,以提高整体效能与质量。



1. 一种生物样本的核酸产物萃取方法,其特征在于:

提供一生物样本处理装置(100),包含一管柱(1030),具有一第一管体部(10)及一第二管体部(30),所述管柱(1030)为中空且两端开放,使所述管柱(1030)内形成一流道,且所述第一管体部(10)之一开放端缘形成一第一开口(11),所述第二管体部(30)之一开放端缘形成一第二开口(33),其中,所述管柱(1030)之内径沿一轴向方向自所述第一开口(11)向所述第二开口(33)逐渐缩减,使所述第一管体部(10)之平均内径大于所述第二管体部(30)之平均内径,以及一托座(60),同轴设置于所述第一管体部(10)中,且所述托座(60)具有复数通孔(6010);

提供一固态生物样本(56),是放置所述托座(60)上;

提供一裂解液试剂(70),使所述的裂解液试剂(70)通过所述第二管体部(30)之所述第二开口(33)并通过所述托座(60)上的所述通孔进入所述第一管体部(10)中,以取得所述固态生物样本(56)的一核酸产物(564)。

2. 根据权利要求1所述之生物样本的核酸萃取方法,其特征在于,所述的裂解液试剂(70),是进一步由一自动化核酸萃取设备提供。

3. 根据权利要求1所述之生物样本的核酸萃取方法,其特征在于,所述的固态生物样本(56)为一FFPE样本。

4. 根据权利要求2所述之生物样本的核酸萃取方法,其特征在于,所述的裂解液试剂(70)为至少一石蜡溶剂、一裂解溶剂及一蛋白酶所混成之混合溶剂。

5. 根据权利要求2所述之生物样本的核酸萃取方法,其特征在于,所述的裂解液试剂(70)为至少一二甲苯、一PKD缓冲液及一蛋白酶所混成之混合溶剂。

6. 根据权利要求2所述之生物样本的核酸萃取方法,其特征在于,所述的裂解溶剂为一细胞裂解液。

7. 根据权利要求1所述之生物样本的核酸萃取方法,其特征在于,所述的核酸产物为DNA或RNA其中之一。

8. 根据权利要求2所述之生物样本的核酸萃取方法,其特征在于,所述的核酸产物为DNA或RNA其中之一。

生物样本的核酸产物萃取方法

技术领域

[0001] 本发明有关一种核酸产物萃取方法,尤其关于一种生物样本的核酸产物萃取方法。

背景技术

[0002] 随着基因之鉴定、检测、诊断等技术应用蓬勃发展与普及,众多技术领域对于核酸萃取技术之需求日益增加;且因应大量且快速筛检的需求,核酸萃取技术发展至今,已逐步由人工操作走向自动化。目前无论是临床医疗、基础研究或者法医应用等领域,自动化核酸萃取技术已然成为了不可或缺的工具。

[0003] 目前,常用的核酸萃取的方法种类繁多且各具优缺点,例如:有机溶剂(酚及氯仿)萃取的传统方法,其取得核酸纯度、质量均佳,但步骤繁复冗长且造成有机溶剂毒害的问题;树脂螯合方法(例如Chelex-100树脂),能快速取得核酸但纯度不高,限制了后续的应用;免疫亲和吸附方法,其利用单株抗体吸附核酸达成萃取效果,涉及抗体之制备,成本高,较难普及;管柱吸附方法(column-based method),主要以硅基质管柱吸附配合离心方式操作萃取核酸,简易而有效,成为目前主流的方法之一;磁珠萃取方法,其利用微小的磁珠和磁场作用,于高、低盐溶液环境下吸附或脱附核酸,达到核酸萃取效果,简易且效率高,核酸纯度质量亦佳,亦逐渐成为主流的方法之一。其中,「管柱吸附方法」与「磁珠萃取方法」因其操作简易之特性,易由机械设备取代人工,进而成为现今应用于自动化核酸萃取的主流方法。

[0004] 针对高通量、快速筛检的需求,自动化核酸萃取平台的发展十分热络,尤以「管柱吸附方法」与「磁珠萃取方法」为大宗。其中「磁珠萃取方法」因其对于DNA的萃取效果优越,在DNA的萃取领域方面的广泛应用居领先地位,但对于RNA的萃取的应用能力稍弱;另一方面,「管柱吸附方法」对于RNA的萃取能力较佳,但由于需要配合离心或真空吸引取方法使用,过程相对较为繁复而耗时,且必须于平台中装设离心装置或真空吸引装置,导致设备体积庞大,因此在自动化方面,仍以体积轻巧的「磁珠萃取方法」仍较占有优势而普遍。

[0005] 然而,无论采用何种方法,目前在自动化核酸萃取平台的建构与优化上,均以尽可能减少人工操作的「完全自动化」为目标,具体的需求包括:减少人员与样本或检体的接触与操作、防止气雾(aerosol)形成、防止样本交叉污染、提高平台运作的稳定度及精确性、提升萃取的效能与核酸产物的质量等;尤其针对可能存有生物危害疑虑的生物样本,或是法医鉴识用生物样本,上述需求显得格外重要。

[0006] 就现况而言,在核酸萃取的处理流程上仍需要一定程度的人工参与进行操作,其中以生物样本的「前处理」步骤仍难以完全套用至自动化系统,需要人工手动处理。此所谓生物样本的前处理步骤主要包含对于生物来源组织的采集与裂解。

[0007] 举例言之,传统的生物样本的前处理程序,是将生物样本(生物组织、检体)置入试管,再加入处理试剂,使处理试剂与生物样本充分混合,供后续萃取流程之用。传统上,为加速生物样本的前处理程序,常采用实心柱塞置入试管容器中,以搅拌或捣磨等手段促进样

本与处理试剂之间的混合、裂解效果,然而,这样的手法若操作不慎,或柱塞与试管的构型相对位置或构型设计不当,容易造成内容物(液体)溢出甚至产生喷溅等重大问题;另一方面,生物样本碎屑亦可能堵塞或干扰核酸萃取流程各阶段检体之搜集,因此,这类型的技术仍难以达成快速混合样本与处理试剂的效果,亦不利于后续的收集,不适合应用于自动化核酸萃取平台。

[0008] 另一方面,前述的搅拌或捣磨式的技术亦难以适用于「固态生物样本」。此谓「固态生物样本」是指非流质之生物样本,广泛包含:软质或固态之动植物组织;可能沾附有生物组织(血液、皮屑、体液、分泌物等)之固态物质如采样棉棒、石蜡包埋之生物组织样本、烟蒂、及各种刑事方面的迹证或检体等。由于固态生物样品上所附载的生物组织多半具有微量、分散或破碎等特性,因此,前处理过程攸关取得检体之含量与质量。更具体而言,在前处理过程中,固态生物样本必须与处理试剂相当充分地混合,方可完整地将其附载的生物组织充分释出至处理试剂环境中,供进一步的核酸萃取,以取得浓度与质量均理想的核酸产物。因此,就前述的传统方法而言,用于流质之生物样本时,已存有液体溢出、碎屑干扰等问题,若应用至固态生物样本,其可引发的干扰效果可能加重前述技术之缺失。

[0009] 对于前述传统技术之问题,中国台湾专利申请案公开第201311885号说明书中提出了一种柱塞装置,是用于试管内,对生物样本进行液体处理。参见图1,此柱塞1为中空圆柱,底部设有孔洞3,柱面上亦形成若干狭长孔4,藉由在盛装了生物样本5与处理液的试管2内上下来回移动,使生物样本5与处理液充分混合;并于混合后,不必移开柱塞1而允许移液管6经由柱塞1顶部之开口汲取试管2内之混合液体7而不会汲取到生物样本5之碎屑,以利萃取核酸。虽然此柱塞装置之设计针对生物样本于试管内的前处理程序所存有的问题,提出了一种解决方案,就实务上而言,此柱塞装置应用于自动化核酸萃取平台时,仍存有多项缺失,详如下述。

[0010] 其一,由于在进行核酸萃取时所采用的处理液(例如裂解液)常为高盐溶液且常添加有酶、界面活性剂等成分,用以促进生物样本释出,因此黏度通常较高;因此,当使用柱塞1时,上下移动柱塞1使试管2内的处理液受到柱塞1的挤压后,通过孔洞3与狭长孔4或流动于由试管与柱塞之间的间隙,虽然能有效产生搅动效果,但由于处理液较为黏滞之特性,同时影响了处理液通过孔洞3与狭长孔4的流畅度,对于空间狭小的试管内之液体产生明显扰动,增加液体喷溅的风险;尤其当施力不当时,即可能导致液体溅出试管2之外。其二,当处理液中含有酶、界面活性剂等添加成分时,影响了处理液整体的表面张力,因而使处理液在通过孔洞3与狭长孔4时可能产生黏附于孔缘或柱塞壁之现象,阻滞处理液的流动,甚至引发液体滴落的问题。其三,在混合生物样本5与处理液时,产生泡沫为常见的问题,然而,当应用前述之柱塞1混合生物样本5与处理液时,由于处理液频繁遭受挤压而流通于孔洞3、狭长孔4及试管2与柱塞1之间的间隙,将加剧泡沫产生的问题,干扰操作。其四,根据柱塞1之设计,操作柱塞1时必须上下移动,使部分的柱塞1仍须暴露于试管外;且于柱塞1移动同时,试管内的液体亦处于流动的状态,形成一极不稳定的系统,使柱塞1滴落处理液可能性增高。其五,根据上述潜在顾虑,此柱塞装置不适宜快速地上下移动,故难以提升核酸萃取效率。此外,前述各问题均可能导致气雾(aerosol)形成、交叉污染、感染危害等不良效应。

[0011] 综上所述,目前针对自动化核酸萃取平台之生物样本前处理技术,尚有多项缺点亟待克服。

发明内容

[0012] 针对上述技术问题与需求,本发明提供一种生物样本的核酸产物萃取方法,其特征在于:提供一生物样本处理装置,包含一管柱,具有一第一管体部及一第二管体部,所述管柱为中空且两端开放,使所述管柱内形成一流道,且所述第一管体部之一开放端缘形成一第一开口,所述第二管体部之一开放端缘形成一第二开口,其中,所述管柱之内径沿一轴向方向自所述第一开口向所述第二开口逐渐缩减,使所述第一管体部之平均内径大于所述第二管体部之平均内径,以及一托座,同轴设置于所述第一管体部中,且所述托座具有复数通孔;提供一固态生物样本,是放置所述托座上;提供一裂解液试剂,使所述的裂解液试剂通过所述第二管体部之所述第二开口并通过所述托座上的所述通孔进入所述第一管体部中,以取得一核酸产物。

[0013] 其中,所述的裂解液试剂(70),是进一步由一自动化核酸萃取设备提供。

[0014] 其中,所述的固态生物样本(56)为一FFPE样本。

[0015] 其中,所述的裂解液试剂(70)为至少一石蜡溶剂、一裂解溶剂及一蛋白酶所混成之混合溶剂。

[0016] 其中,所述的裂解液试剂(70)为至少一二甲苯、一PKD缓冲液及一蛋白酶所混成之混合溶剂。

[0017] 其中,所述的裂解溶剂为一细胞裂解液。

[0018] 其中,所述的核酸产物为DNA或RNA其中之一。

[0019] 因此,本发明的主要目的是提供一种生物样本的核酸产物萃取方法,提供了一种可直接应用于现有自动化核酸萃取设备之生物样本前处理装置,有效提升效能,大幅减低既有技术与人工操作可能衍生之气雾(aerosol)形成、交叉污染、感染危害等不良效应。

附图说明

[0020] 图1,是先前技术的生物样本处理装置示意图。

[0021] 图2,是根据本发明的生物样本处理装置的透视图。

[0022] 图3A,是根据本发明的一实施例的生物样本处理装置的立体分解图。

[0023] 图3B,是根据本发明的另一实施例的生物样本处理装置的立体分解图。

[0024] 图4A,是根据本发明的一实施例的生物样本处理装置的剖视图。

[0025] 图4B,是根据本发明的一实施例的生物样本处理装置的剖视图。

[0026] 图5,是根据本发明的生物样本处理装置的局部放大示意图。

[0027] 图6A、6B、6C、6D、6E、6F,是根据本发明的生物样本处理装置的托座示意图。

[0028] 图7A、7B、7C、7D,是根据本发明的是根据本发明的生物样本处理装置的托座示意图。

[0029] 图8,是先前技术的人工操作生物样本前处理的流程示意图。

[0030] 图9,是先前技术的人工操作生物样本前处理供自动化核酸萃取的流程示意图。

[0031] 图10,是本发明的生物样本处理装置使用于自动化核酸萃取前处理程序的流程示意图。

[0032] 图11,是根据本发明的实验例1与对照例1所得的核酸胶体电泳图。

[0033] 图12,是根据本发明的实验例2与对照例2所得的核酸胶体电泳图。

[0034] **【主要组件符号说明】**

[0035]	轴向方向	A
[0036]	中心轴	C
[0037]	径向方向	R
[0038]	驱动方向	T
[0039]	柱塞	1
[0040]	试管	2
[0041]	孔洞	3
[0042]	狭长孔	4
[0043]	生物样本	5
[0044]	移液管	6、80
[0045]	混合液体	7
[0046]	第一管体部	10
[0047]	第一开口	11
[0048]	盖体	20
[0049]	第二管体部	30
[0050]	第二开口	33
[0051]	阻隔件	40
[0052]	固态样本	50
[0053]	FFPE样本	52、56
[0054]	储液容器	70
[0055]	试剂	90、92、96
[0056]	生物样本处理装置	100、200
[0057]	第一管道	101
[0058]	第一螺纹	110
[0059]	中空内栓	201
[0060]	顶盖部	203
[0061]	气道	204
[0062]	第二螺纹	210
[0063]	第二管道	301
[0064]	微量离心管	500
[0065]	裂解检体	521、522、523、561、562、563
[0066]	检体碎屑	524
[0067]	核酸	564
[0068]	托座	60、601、602、603、604、605、606、607、608、609、610
[0069]	滤塞	801
[0070]	水层	901
[0071]	有机层	902

[0072]	管柱	1030
[0073]	管壁	1032
[0074]	底板	2010
[0075]	穿透孔	2011
[0076]	内栓气流道	2020
[0077]	顶盖孔	2030
[0078]	通孔	6010、6020、6030、6050、6060、6070、6090、6010、6020、6030、6050、6060、6070、6080、6090、6100
[0079]	滤网	6040
[0080]	托座侧壁	6071、6081
[0081]	托座面	6072、6082、6092、6102
[0082]	肩部	6074、6084
[0083]	核酸产物PCR检测结果	11a、11b、12a、12b
[0084]	粗萃取液	901'、92'、96'
[0085]	电泳结果	A1、A2、A3、A4、A5、A6、A7、M1、M2、M3、M4、M5、M6、M7

具体实施方式

[0086] 为使本发明之目的、技术特征及优点，能更为相关技术领域人员所了解，并得以实施本发明，在此配合所附之图式，具体阐明本发明之技术特征与实施方式，并列举较佳实施例进一步说明。以下文中所对照之图式，是表达与本发明特征有关之示意，并未亦不需要依据实际情形完整绘制；而关于本案实施方式之说明中涉及本领域技术人员所熟知之技术内容，亦不再加以赘述，合先叙明。

[0087] 为利于说明本发明，请参见图2所示本发明之一实施例，先行定义本发明是按生物样本处理装置100中管柱1030（外观上为圆柱状）之长度方向，定义其为「轴向方向」A，且生物样本处理装置100沿此轴向方向A具有一假想之中心轴C；而按管柱1030之横向方向（即圆柱之横截面方向），定义其为「径向方向」R。此外，基于前述之中心轴C，本发明之各组件设置时，如以此中心轴C为中心点加以设置，则以「同轴」之用语描述之。

[0088] 参见图2，本发明之生物样本处理装置包含管柱1030、盖体20及托座60。以下依序详述其实施方式。

[0089] 首先，本发明之管柱1030是沿轴向方向A依序形成第一管体部10及第二管体部30。且管柱1030为中空且两端开放，使该管柱1030内形成流道，且此流道按照第一管体部10、第二管体部30可进一步依序区分为第一管道101及第二管道301。其中，第一管体部10沿轴向方向A于邻近管柱1030之开放端之开放端缘形成第一开口11，第二管体部30沿轴向方向A于邻近管柱1030之开放端之端缘形成第二开口33。其中，由于管柱1030为中空，因而使管道1030向R方向具有特定内径，而流道沿径向方向具有特定之管径（即沿径向方向之直径），且管柱1030与流道位于同一横截面位置时，管柱1030之内径与流道之管径实质上相同。管柱1030之内径与流道之管径大小可藉由调整管柱1030之管壁1032的厚度达成，且本发明不限制管壁1032的厚度分布，若因应目前技术实施时制造与使用本发明之常态，本发明是以管壁1032整体厚度一致为较佳实施例。惟根据本使用者可依需求调整管壁1032于管柱1030不

同位置之厚度、构形以达成不同之效果,例如:减少其厚度以节省材料成本或提升管壁之透明度、增加其厚度以强化结构或调整机械性能、调整其构形以利流体环境优化等,均应涵盖于本发明之范畴内。

[0090] 其次,根据本发明之生物样本处理装置100之设计,管柱1030之内径沿轴向方向A自第一开口11向该第二开口33逐渐缩减,使第一管体部10之平均内径(根据本发明之一较佳实施例,可视之为第一管道101之平均管径)大于第二管体部30之平均内径(根据本发明之一较佳实施例,可视之为第二管道301之平均管径);而在一较佳实施例中,第二开口33的直径大小一般为0~3mm之间,较好的直径大小为1~3mm之间,最佳的直径大小在1~1.5mm之间。根据此管柱1030之设计,使生物样本处理装置100整体呈现漏斗状,由平均内径较小的第二管体部30构成一吸管状的尖端,由第二开口33作为液体试剂出入口,有助于在生物样本前处理程序中进行液体试剂的汲取与排放。

[0091] 本发明生物样本处理装置100之盖体20,是同轴设置于第一开口11上,用以连接第一管体部10。根据本发明之一较佳实施例,盖体20具有衔接管柱1030与移液设备(提供移液的驱动力)的功能,使生物样本处理装置100能藉由盖体20连接至移液设备,以驱动生物样本前处理程序中所使用之试剂液体的移动;而根据现有技术而言,移液设备主要仍以抽吸气体之手段作为驱动液体移动的动力来源,此为本领域技术所能轻易了解,故不再行赘述。

[0092] 为达成上述目的与效果,参见图2、3A、3B,其中图3A是根据本发明之一实施例之生物样本处理装置之立体分解图,而图3B是根据本发明之另一实施例之生物样本处理装置之立体分解图。如图3A所示,盖体20进一步设有一顶盖部203与自盖体20一端延伸的一中空内栓201;在操作时,中空内栓201可以由第一开口11同轴置入第一管道101中;且顶盖部203顶部中央形成顶盖孔2030,使中空内栓201与顶盖孔2030形成气道204,且气道204与管柱1030之流道相互连通,于移液设备抽吸气体时,此气道204即为气体流动之通道。此外,在实施制造本发明之盖体20时,顶盖部203与中空内栓201可采用一体成形之制造方式产制(如图3A所示);亦可采用分别制造顶盖部203与中空内栓201之后加以组装成盖体20(如图3B所示)。

[0093] 此外,根据本发明之较佳实施例,盖体部203与第一管体部10之间是以螺纹、卡榫或嚙合连接。螺纹、卡榫或嚙合连接是为本领域常用之组件连接手段,其原理与操作方式不再详述于此。在实施上,使用者可依需求采用螺纹、卡榫、嚙合等方式达成连接盖体20与第一管体部10;例如:螺纹连接具有容易组装且可再度拆卸之特性;而卡榫连接同样易于组装,亦于制造,且其紧固效果佳;嚙合连接,设计与制造简易。根据本发明之一较佳实施例,盖体20与第一管体部10连接后达成气密效果有利于移液设备驱动试剂液体之移动,故本发明是以盖体20与第一管体部10是以螺纹连接为较佳实施态样,以同时达成紧固连接与气密的效果;同样地,当采用其他连接手段时,本发明亦涵盖采用各种密封环(O-ring)或其他辅助组件,使盖体20与第一管体部10达成气密效果之态样。

[0094] 此外,螺纹、卡榫及嚙合之技术手段均已具有现成规格之产品与模具设计可直接套用,有利制造并便于用户弹性应用。因此,本发明不限制盖体20与第一管体部10之连接方式,亦不排除一体成形之制造方法,惟盖体20能达成连接管柱1030与移液设备之功能与前述之各项效果者,均应涵盖于本发明之范畴。为利于简洁说明,下文仅以螺纹连接之手段说明本发明生物样本处理装置100之实施方式。

[0095] 请参见图3A及图4A,其中图4A是根据本发明之一实施例之生物样本处理装置之剖

视图。本发明之生物样本处理装置100,其是采用螺纹连接之手段将盖体20连接至第一管体部10;具体而言,第一管体部10之端缘邻近第一开口11之外壁形成第一螺纹110,而顶盖部203之内缘对应地设有第二螺纹210,使中空内栓201由第一开口11同轴置入第一管道101后,第二螺纹210旋接至第一螺纹110,达成螺纹连接,以紧固接合第一管体部10与盖体20;同样地,当有拆卸第一管体部10与盖体20需求时,使用者也能轻易地反向旋开第一管体部10与盖体20,解除两者之接合。

[0096] 请进一步参见图4B,是示意生物样本处理装置100之设置方式及使用于移液设备时的相对位置。其中,生物前处理程序所用之试剂主要为液体,由储液容器70盛放,由第二管体部30开放端伸入储液容器70,并由第二开口33汲取或排放试剂液体,使试剂液体可于第一管道101与第二管道301中流动。

[0097] 请再参见图2、4A、4B,由于手动操作或非全自动之生物样本前处理程序可能产生交叉污染的问题,因此本发明进一步在顶盖部203并于相对顶盖的另一端上形成一底板2010且在底板2010上配置一穿透孔2011;其中,穿透孔2011可以供气体流通,具有气体导流功能,亦用以避免试剂液体于操作过程中溅起,导致沾染移液设备造成污染的问题。此外,此穿透孔2011的直径大小与管柱1030的第二开口33直径大小配合,小于或等于第二开口33的直径大小,直径大小一般为0~3mm之间,较好的直径大小为1~3mm之间,最佳的直径大小在1~1.5mm之间。穿透孔2011与第二开口33直径大小配合的主要因素在于:当穿透孔2011过小,在试剂液体受操作过程挤压通过穿透孔2011时会因挤压产生气泡,进而将干扰实验操作;而穿透孔2011若过大,则可能会造成生物样本阻塞穿透孔2011之问题,因此本发明进而限定穿透孔2011的大小需管柱1030的第二开口33大小配合,小于或等于第二开口33的大小。为避免生物样本前处理程序中交叉污染的问题,根据本发明之一较佳实施例之生物样本处理装置100,其于气道204内进一步设有一阻隔件40,是与管柱1030同轴设置,用以封闭并阻隔试剂流向第一开口11。

[0098] 因此,当试剂液体于第一管道101与第二管道301中流动时,一方面可控制移液设备之气流(施力大小)以避免试剂液体冲向第一开口11;另一方面,内栓204朝第二开口33之方向为半封闭式与穿透孔2011之设计既可达成气体导流之功能,亦能有效阻挡试剂液体过度流向移液设备;此外,参见图5,示意气体于内栓204内所构成之内栓气流道2020及气体沿驱动方向T流动之情形,由此可见,阻隔件40之设计亦整体强化了防范试剂液体回流之效果。根据上述目的与功能,阻隔件40之材质以兼具气体通透性与防水性为较佳实施态样,此所谓之防水性是广泛地指向阻挡液体流动之效果,除了透气的防泼水材料外,具有特定体积之液体吸收能力的材料亦可达成防水性。具体而言,阻隔件40材质较佳为海棉、滤棉、防尘棉、透气滤膜等材质。

[0099] 再接着,请参见图2、3A、3B、4A、4B。本发明之生物样本处理装置包含托座60,是同轴设置第一管道101中,用于托持生物样本;其中,托座60具有复数通孔使试剂通过这些通孔,使试剂液体可于管柱1030之流道内往复流通。根据本发明之概念,托座60是托持生物样本,藉由其上之通孔使试剂液体充分接触生物样本,并藉由驱动试剂液体于管道内往复流通,达成冲刷生物样本,促进带有核酸成分之生物组织释出。据此目的,本发明之托座60是以稳定固设于管柱1030之流道为较佳实施态样。

[0100] 根据本发明之一实施例,托座60外观大致呈现一扁圆柱状,托座60之外径实质上

小于第一管道10之内径而大于或等于第二管道30之内径；因此，基于前述生物前处理装置100、200第一管体部10之平均内径大于第二管体部30之平均内径使之构形，当托座60与管柱1030分开制造后再行组装时，托座60是先行同轴置入第一管道101后，由平均内径小于第一管道101之第二管道301抵住托座60达成固设效果。根据本发明之另一实施例，为达成同轴设置托座60之效果，可于第一管道101或第二管道301内设有嚙合齿、突肋等构造组件并对应调整托座60之外观设计，使嚙合齿、突肋等构造组件对应扣合或抵接托座60，达成固设托座60效果。根据本发明之另一实施例，托座60与管柱1030亦可由一体成形之制造方式达成固设，进而免除了组装托座60之工序。

[0101] 关于本发明之托座，本发明不特别限制其通孔之设计，可为各种几何形状之通孔，且通孔径（其实质对应于通孔之截面积）包含广泛的尺寸分布。举例言之，参见图6A、6B、6C、6D，是举例示意本发明之托座60之通孔之多种态样：图6A是示意托座601设有多个矩形之通孔6010，且通孔6010规则排列，其中，通孔6010的直径大小一般为0~3mm之间，较好的直径大小为1~3mm之间，最佳的直径大小在1~1.5mm之间。图6B是示意托座602设有多个圆形或椭圆形之通孔6020，且通孔6020以不规则方式排列，其中，通孔6020的直径大小一般为0~3mm之间，较好的直径大小为1~3mm之间，最佳的直径大小在1~1.5mm之间。图6C是示意托座603设有多个菱形之通孔6030，且通孔6030以规则方式排列，其中，通孔6030的直径大小一般为0~3mm之间，较好的直径大小为1~3mm之间，最佳的直径大小在1~1.5mm之间。图6D是示意托座603之通孔之功能，可由同样具有通孔或通透网格之滤网6040取代实施，同样可达成前述托持生物样本并使试剂液体流通等功能。图6E是示意托座605设有多个由小形的狭缝所构成之通孔6050，其中，通孔6050的直径大小一般为0~3mm之间，较好的直径大小为1~3mm之间，最佳的直径大小在1~1.5mm之间。第6F图是示意托座606设有多个由小形且弯曲的狭缝所构成之通孔6060，其中，通孔6060的直径大小一般为0~3mm之间，较好的直径大小为1~3mm之间，最佳的直径大小在1~1.5mm之间。在第6A、6B、6C、6D图中通孔6010、6020、6030、6040、6050的直径大小是与管柱1030的第二开口33直径大小配合，小于或等于第二开口33的直径大小，其当通孔6010、6020、6030、6040、6050过小，在试剂液体受操作过程挤压通过穿透孔2011时会因挤压产生气泡，进而将干扰实验操作；而通孔6010、6020、6030、6040、6050若过大，则会造成生物样本阻塞之问题，因此，本发明通孔6010、6020、6030、6040、6050的直径大小需管柱1030的第二开口33直径大小配合，小于或等于第二开口33的大小。以避免试剂液体在操作过程中产生气泡及造成生物样本阻塞通孔6010、6020、6030、6040、6050之问题。

[0102] 关于本发明之托座，本发明不特别限制其构形设计。举例言之，参见图7A、7B、7C、7D，是示意本发明之托座60因应不同需求。现仅列举四种托座之实施态样加以说明：图7A是示意一圆盘状之托座607，其托座面6072上设有多个圆形或椭圆形的通孔6070，沿着圆盘状之托座607周缘形成向上突起之肩部6074，托座607之托座侧壁6071为直壁，使托座607整体呈现对称之圆盘状，此圆盘之设计有利于稳定盛装生物样本，且其周缘侧壁与管柱内壁之摩擦面积大，可强化固设托座607之效果。图7B是示意另一圆盘状之托座608，其托座面6082上设有多个圆形或椭圆形的通孔6080，沿着圆盘状之托座608周缘形成向上突起之肩部6084，使托座608整体呈现对称之圆盘状；须说明者，托座608之托座侧壁6081为弧形托座侧壁6081，此设计之适用时机包括当托座608为橡胶、高分子弹性塑料等弹性体所构成时，可

藉由弧形托座侧壁6081之设计达成固设效果；而当需要强化硬质之托座608之固设效果时，本发明亦纳入采用密封环(O-ring)等辅助组件之手段达成，此时密封环便可设置于弧形托座侧壁6081或其他构形之托座侧壁所形成之空间内，此态样有助于优化试剂液体的流体稳定性，更适用于自动化。图7C是示意另一圆盘状之托座609，其托座面6092上设有多个矩形通孔6090，沿着圆盘状之托座609周缘形成向上突起之肩部6094，使托座609整体呈现对称之圆盘状，此态样说明本发明不特别限制托座所设通孔之构形。图7D是示意一构形简单且易于制造之托座610，其上设有多个通孔6100，然而其托座面6102平坦无肩部设计，此简单构形可降低产制成本，尤其适用于生物样本充足之大量、快速筛检用之自动化核酸萃取平台。

[0103] 须说明者，本发明并不限制外接移液设备的种类，且为了免除增设或大幅调整移液设备及衍生的问题，本发明是以配合现有之移液设备常用之装置规格为较佳实施态样，而关于自动化移液设备之装置原理与常用规格是本领域技术人员所熟知，故不再加以赘述。然而，当未来移液设备逐步改良时，根据本发明之设计，亦可藉由调整盖体部203之构形设计而达成，不仅减低产制成本，亦能弹性应用至各种移液设备，进而使本发明更容易普及。

[0104] 为更易于了解本发明之生物样本处理装置之具体实施内容、可解决之技术问题与达成之效果，以下列举实验例，并配合相关示意与数据图式加以说明。

[0105] 首先，简述说明传统人工操作生物样本前处理之流程。由于自动化核酸萃取平台适用的生物样本种类繁多，其中以固态生物样本之前处理的难度较高，此谓固态生物样本包含但不限于：棉棒、血卡、烟蒂、槟榔渣、口香糖渣、头发、胶带等)与福尔马林固定石蜡包埋生物组织样本(以下简称FFPE样本)，较容易产生技术缺失影响核酸萃取表现；因此，以下说明是分别以「固态生物样本」与「FFPE样本」作为本发明用以实施生物样本前处理程序之态样，并据之列举实验例与对照例。

[0106] 本发明适用于各种自动化核酸萃取平台(设备)之生物样本前处理程序，例如前述采用管柱吸附方法、磁珠萃取方法等自动化核酸萃取平台；然而，为利于简洁示意与说明本发明之实施效果，以下说明之实验例与对照例所提及之人工操作方法是采用市售之试剂套组(MagCore® Genomic DNA Tissue Kit)配合市售之自动化核酸萃取设备(MagCore® Automated Nucleic Acid Extractor)进行操作，其原理与操作细节均已详尽揭露于产品说明内，是本领域技术人员可轻易明瞭及依循操作，故不再于此详述，合先叙明。

[0107] 参见图8，是先前技术以传统人工操作固态样本前处理之流程示意图。简言之，将固态样本50置入微量离心管500后，以移液管80汲取试剂90并加入微量离心管500中，将固态样本50与试剂90充分混合，先以56℃加热1小时后再以90℃加热1小时，促使生物组织裂解释出。其中，由于试剂90之成分含有油相溶液(或有机溶液)与水相溶液，经前述加热与裂解程序后产生分层，下层为水层901，上层为有机层902。接着，以移液管80吸取下层之水相层液将水层901移出，即取得粗萃取液901'，此粗萃取液901'是用于后续核酸萃取程序。此传统方法人工操作时，移液管80以选用设有滤塞801的移液管80为佳，以避免人工操作所衍生的交叉污染问题。

[0108] 参见图9，是先前技术以传统人工操作FFPE样本52前处理之流程示意图。针对FFPE样本52，由于现采用之试剂套组已具备良好的裂解FFPE样本之效果，其操作流程大致上同

于前述处理固态样本之50。简言之,将FFPE样本52置入微量离心管500中,以移液管80汲取试剂92并加入微量离心管500中,将FFPE样本52与试剂92充分混合,先以56℃加热1小时后再以90℃加热1小时,使FFPE样本52中所含有之石蜡融解同时暴露并裂解其中之生物组织检体,如图9中裂解检体521、裂解检体522、裂解检体523所示。接着,完成加热裂解的步骤后,裂解检体521、522、523经由充分裂解,形成粗萃取液92'与残留之检体碎屑524,其中,此粗萃取液92'是用于后续核酸萃取程序,惟在使用上仍需要以离心手段去除检体碎屑524之干扰。

[0109] 由此可见,上述传统方法须于执行自动化核酸萃取之前,由人工操作生物样本前处理之程序,难以避免操作繁复与人工操作衍生的诸多问题,因此,本发明现提出了一有效之解决方案。

[0110] 参见图10,是以本发明之生物样本处理装置100,配合自动化核酸萃取设备进行全自动化操作FFPE样本56前处理之流程示意图;此外为简洁说明,图10仅简单示意自动化操作装置与生物样本处理装置100接触的接口部份,故并未显示整个自动化操作装置。

[0111] 现同样以FFPE样本56之前处理为例:首先,将FFPE样本56置入管柱内,由托座60托持FFPE样本56,之后将盖体组装至管柱完成生物样本处理装置100,继而装设至自动化核酸萃取设备(例如:型号 MagCore® 系列设备)进行自动化操作。载有FFPE样本56之生物样本处理装置100深入储液容器70中,由管柱1030的第二开口33处汲取试剂96(例如:裂解液、细胞裂解液),使试剂96通过托座60上之通孔与FFPE样本56混合;接着,按默认的流速、吸放频率与试剂体积,驱动试剂96于流道内往复流通,达成充分混合试剂96与FFPE样本56的效果;同时,按预先设定之温控加热程序,使试剂96与FFPE样本56之混合物于混合时同步均匀受热,促进裂解效果,使FFPE样本56所含之生物组织检体释出,如裂解检体561、562、563所示。FFPE样本56经由前处理程序之充分的混合与裂解后,释出所含之核酸564至粗萃取液96'中,此时即可由自动化核酸萃取设备直接取得粗萃取液96'供后续核酸萃取使用。而针对不同类型(体积、生物组织种类等)的FFPE样本与各项需求,用户可预先弹性调整加热程序与试剂吸放程序之排程,以进一步提高前处理之效能。

[0112] 请参见以下实验例与对照例之叙述,进一步呈现本发明所达成之效果。

[0113] 实验例1:

[0114] 本实验例采用固态生物样本为采检所用之棉棒。事先将棉棒沾取定量血液(20 μ l、15 μ l、10 μ l、5 μ l),再将沾血棉棒分别置入本发明之生物样本处理装置中,旋紧盖体后,直接装设至自动化磁珠萃取设备(型号: MagCore® Super;RBC bioscience)后,自动化进行生物样本之前处理程序以及核酸萃取程序,各固态生物样本最终可取得60 μ l之核酸产物。

[0115] 对照例1:

[0116] 本对照例采用固态生物样本为采检所用之棉棒。事先将棉棒沾取定量血液(20 μ l、15 μ l、10 μ l、5 μ l),再将沾血棉棒放入微量离心管中,由人工加入裂解液及蛋白酶K,将微量离心管置于加热器上以55℃持续加热30min以取得裂解产物(lysate),即完成前处理程序;接着,将裂解产物以人工操作转移至自动化磁珠萃取设备所使用之反应槽中,后续以磁珠萃取方法分离萃取核酸产物。本实施例是将前处理完之溶液直接应用至自动化磁珠萃取设备(型号: MagCore® Super,RBC bioscience)进行自动化核酸萃取程序,各固态生物样本

最终可取得60 μ l之核酸产物。

[0117] 根据上述实验例1与对照例1所得之核酸产物,进一步以聚合酶连锁反应(以下简称PCR)方法,扩增稳定表现基因「甘油醛3-磷酸脱氢酶」(Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase;以下简称GADPH)的DNA,确认其浓度与质量是否适用于后续分析,相关结果如图11所示。参见图11,实验例1之核酸产物PCR检测结果11b显示,沾血量20 μ l之电泳结果A1、沾血量15 μ l之电泳结果A2、沾血量10 μ l之电泳结果A3、沾血量5 μ l之电泳结果A4均显示了明显而清晰的PCR产物,表示无论血液检体含量多寡,其扩增效果均良好,同时反映经由实验例1之方法所取得之核酸质量理想,适用于后续的基因检测。反观对照例1之核酸产物PCR检测结果11a,沾血量20 μ l之电泳结果M1、沾血量15 μ l之电泳结果M2、沾血量10 μ l之电泳结果M3、沾血量5 μ l之电泳结果M4,显示其PCR产物之亮度稍弱,且PCR产物量不稳定,尤其沾血量15 μ l之电泳结果M2以及沾血量5 μ l之电泳结果M4的产物量明显较少,反映出生物样本前处理程序可能不尽理想所导致的结果。

[0118] 实验例2:

[0119] 本实验例采用固态生物样本为FFPE样本,并进一步依据FFPE样本的体积区分为大型、中型、小型样本。需说明者,由于此实验例旨在验证不同前处理方式是否会影响到不同体积之FFPE样本之核酸萃取效果,故不对于体积大小加以具体定义,惟执行时,仍遵循实验例2与对照例2大型、中型、小型样本体积相同之原则,以利比较。此外,由于大型FFPE样本可能为长条状,为加速前处理效能,可将FFPE样本同样地弯折成数等份(每段 \leq 0.5CM为较佳)后再置入生物样本处理装置中。

[0120] 分别将大型、中型、小型样本置入本发明之生物样本处理装置中,加入裂解液试剂。此裂解液试剂是由400 μ l石蜡溶剂、180 μ l裂解溶液(1% SDS;30mM Tris-HCl;10mM EDTA)与20 μ l蛋白酶K(proteinase K)混合而成。于旋紧盖体后,直接装设至自动化磁珠萃取设备(型号:MagCore[®] Super;RBC bioscience);同时开始于56 $^{\circ}$ C环境下加热并进行吸吐混合1小时,接着在90 $^{\circ}$ C环境下加热并吸吐混合1小时,之后将混合液吸取至生物样本处理装置中于室温下静置10分钟,可观察到混合液开始产生分层现象;将下层之水层中之粗萃取液约190 μ l移入新的试管槽后,残留组织则留在生物样本处理装置中。接着,加入200 μ l缓冲液AL(Buffer AL)至水相层液,并加以混合均匀,供后续核酸萃取程序使用。本实验例是以管柱吸附法(层析管柱分离方法)进行核酸分离:加入200 μ l 100%EtOH至粗萃取液中混合均匀后,将所有液体加入层析管柱中,以层析管柱分离方法进行核酸分离,是采用QIAGEN核酸纯化套组(QIAGEN;QIAamp DNA FFPE Tissue Kit;Cat.No.56404)之层析管柱;其操作步骤是依循其产品使用说明,故不在此详述,最终步骤是以60 μ l ATE缓冲液分别冲提并取得大型、中型、小型样本之核酸产物。

[0121] 对照例2:

[0122] 分别将大型、中型、小型样本置入微量离心管中,加入裂解液试剂。此裂解液试剂是由400 μ l石蜡溶剂、180 μ l裂解溶液(1% SDS;30mM Tris-HCl;10mM EDTA)与20 μ l蛋白酶K(proteinase K)混合而成。于加以震荡混合10秒钟,取得混合液。接着,以人工对前述各混合液进行加热,是于56 $^{\circ}$ C环境下加热1小时之后,于室温下稍加静置,同时可将加热器升温至90 $^{\circ}$ C,待加热器温度完成,于90 $^{\circ}$ C环境下加热1小时;过程中适度加以小幅震荡混合促进裂解。由于加热时,微量离心管内会产生水气,因此可稍微短暂离心将水气离下至混合液

中。于此步骤时,可观察到混合液开始产生分层现象;接着,以人工操作移液管吸取下层之水中层中之粗萃取液约190 μ l移入新的微量离心管。加入200 μ l缓冲液AL (Buffer AL) 至水相上层液,并加以混合均匀,供后续核酸萃取程序使用。本对照例是以管柱吸附法(层析管柱分离方法)进行核酸分离:加入200 μ l 100%EtOH至粗萃取液中混合均匀后,将所有液体加入层析管柱中,以层析管柱分离方法进行核酸分离,是采用QIAGEN核酸纯化套组(QIAGEN; QIAamp DNA FFPE Tissue Kit;Cat.No.56404)之层析管柱;其操作步骤是依循其产品使用说明,故不在此详述,最终步骤是以60 μ l ATE缓冲液分别冲提并取得大型、中型、小型样本之核酸产物。

[0123] 根据上述实验例2与对照例2所得之核酸产物,进一步检测其浓度与核酸质量,其结果列示于表1。由表1可知,无论是大型、中型、小型样本,使用本发明之生物样本处理装置所得之核酸产物浓度均高于人工前处理;就特定波长吸光值(OD)之比例(OD 260/280)而言,核酸产物(DNA)质量同于对照之组别(小型样本)或略优于对照之组别(大型、中型样本);就特定波长吸光值(OD)之比例(OD 260/230)而言,自动化前处理组别之有机溶剂的残量状况近似于人工前处理组别。以上数据显示使用本发明之生物样本处理装置,确实适用于自动化核酸萃取,并可有效取得浓度高而质量亦佳之核酸产物。

[0124] 表1.核酸产物检测结果

FFPE 样本尺寸	前处理方法	核酸产物浓度(ng/ μ l)	OD 260/280	OD 260/230
大型	对照例 2: 人工前处理	15.79	1.79	1.06
	对照例 2: 自动化前处理	21.95	1.8	1.17
中型	对照例 2: 人工前处理	5.62	1.71	1.09
	对照例 2: 自动化前处理	9.25	1.75	1.02
小型	对照例 2: 人工前处理	6.83	1.72	1.15
	对照例 2: 自动化前处理	7.43	1.72	1.05

[0125]

[0126] 根据上述实验例2与对照例2所得之核酸产物,进一步以聚合酶连锁反应(以下简

称PCR)方法,扩增稳定表现基因GADPH的DNA,确认其质量是否适用于后续分析,相关结果如图12所示。参见图12,根据实验例2与对照例2:对大型样本分离取得之核酸产物PCR检测结果12a显示;对中型样本分离取得之核酸产物PCR检测结果12b显示;对小型样本分离取得之核酸产物PCR检测结果12b显示。其中,针对大型样本,以人工前处理之电泳结果M5与自动化前处理之电泳结果A5表现相似,惟前者稍弱于后者;针对中型样本,以人工前处理之电泳结果M6显示其未产出PCR产物,而自动化前处理之电泳结果A6则显示其产出PCR产物;针对小型样本,以人工前处理之电泳结果M7显示其未产出PCR产物,而自动化前处理之电泳结果A7则显示其产出PCR产物。由此可见,使由本发明之自动化前处理方法所得之核酸质量良好,足以直接用于后续的分析,而人工前处理之组别虽然可测得核酸浓度,却无法顺利产出PCR产物,显示其质量仍不足以直接使用于核酸分析,需要额外加工或纯化方可使用。

[0127] 除了前述萃取DNA之实施内容外,本发明亦适用于萃取RNA,以下列举实验例3与对照例3说明采用本发明之生物样本处理装置萃取RNA之具体内容。以下实验例3与对照例3是以管柱吸附法(层析管柱分离方法)进行RNA分离,是采用QIAGEN核酸纯化套组(QIAGEN; RNeasy FFPE Kit; Cat.No.73504)之层析管柱;其操作步骤是依循产品说明,不详述于此。

[0128] 实验例3:

[0129] 首先,将FFPE样本折成数等分(每段不大于0.5公分)尽可能不折断置入本发明之生物样本处理装置中,旋紧盖体,由本装置之吸管端汲取裂解液试剂。此裂解液试剂是由400 μ l二甲苯、150 μ l PKD缓冲液与10 μ l蛋白酶K(proteinase K)混合而成。接着,于56 $^{\circ}$ C环境下加热并进行吸吐混合1小时,再接着,在90 $^{\circ}$ C环境下加热并吸吐混合1小时,之后将所有液体吸至生物样本处理装置中于室温静置10分钟,可观察到混合液开始产生分层现象,由本装置之吸管端将下层之水层中之粗萃取液约140 μ l移入新的试管槽后,残留组织则留在生物样本处理装置中。接着,于冰上静置3分钟,接着加入水层总体积十分之一体积的DNA酶缓冲液以及10 μ l的DNA酶原液,上下翻转微量离心管以混合均匀,于室温静置15分。加入320 μ l RBC缓冲液混合均匀后,再加入1200 μ l 100%EtOH,并将所有的样本混合液加入层析管柱中,最终步骤是以60 μ l RNase-free纯水冲提取得核酸产物。

[0130] 对照例3:

[0131] 首先,将FFPE样本折成数等分(每段不大于0.5公分)尽可能不折断置入微量离心管,加入裂解液。此裂解液试剂是由400 μ l二甲苯、150 μ l PKD缓冲液与10 μ l蛋白酶K(proteinase K)混合而成。接着,加以震荡混合10秒钟,取得一混合液。之后进行加热步骤,是将前述混合液于56 $^{\circ}$ C环境下加热15分之后,于室温下稍加静置,同时可将加热器升温至80 $^{\circ}$ C,待加热器温度完成,于80 $^{\circ}$ C环境下加热混合液达15分。加热时,管柱内会产生水气,因此可稍微短暂离心将水气离下至混合液中。于此步骤时,可观察到混合液开始产生分层现象,上层为有机层,下层为水层,而残留组织则留在水层之中。接着,以移液管吸取下层之水层中之粗萃取液约140 μ l移入新的微量离心管后,于冰上静置3分钟,接着加入总水相液层总体积十分之一体积的DNA酶缓冲液以及10 μ l的DNA酶原液,上下翻转微量离心管以混合均匀,于室温静置15分。加入320 μ l RBC溶液混合均匀后,再加入1200 μ l 100%EtOH,并将所有的样本混合液加入层析管柱中,最终步骤是以60 μ l RNase-free纯水冲提取得核酸产物。

[0132] 根据前述本发明之生物样本处理装置,提供了一种可直接应用于现有自动化核酸萃取设备之生物样本处理装置,除可以有效提升效能,并更能有效地大幅减低既有技术与

人工操作可能衍生之气雾 (aerosol) 形成、交叉污染、感染危害等不良效应。

[0133] 虽然本发明已将各种较佳实施例揭露如前述,然其并非用以限定本发明,任何熟习本领域技艺者,在不脱离本发明之精神和范围内,当可作些许之更动与润饰,因此本发明之专利保护范围须视本说明书所附之申请专利范围所界定者为准。

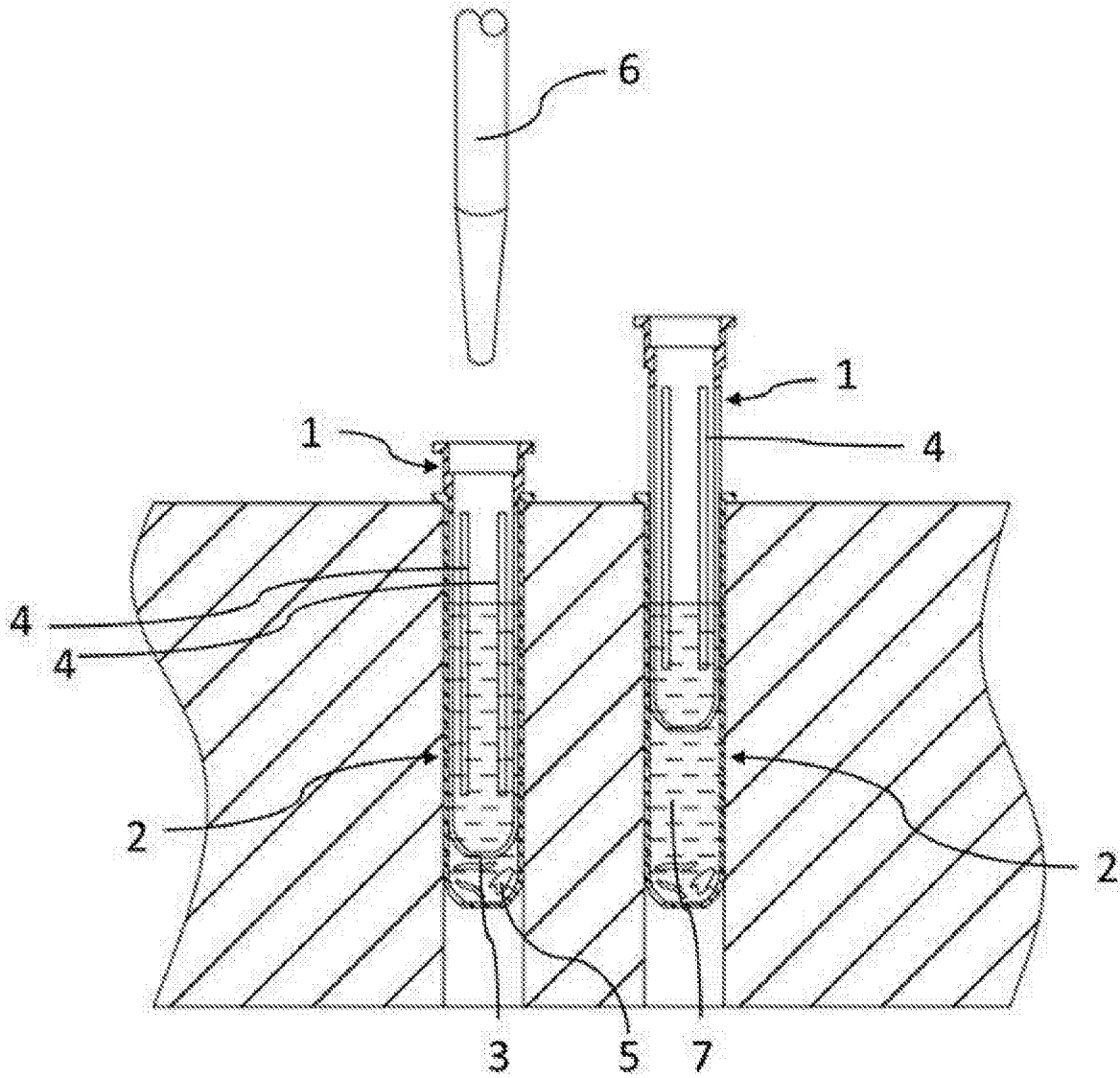


图1

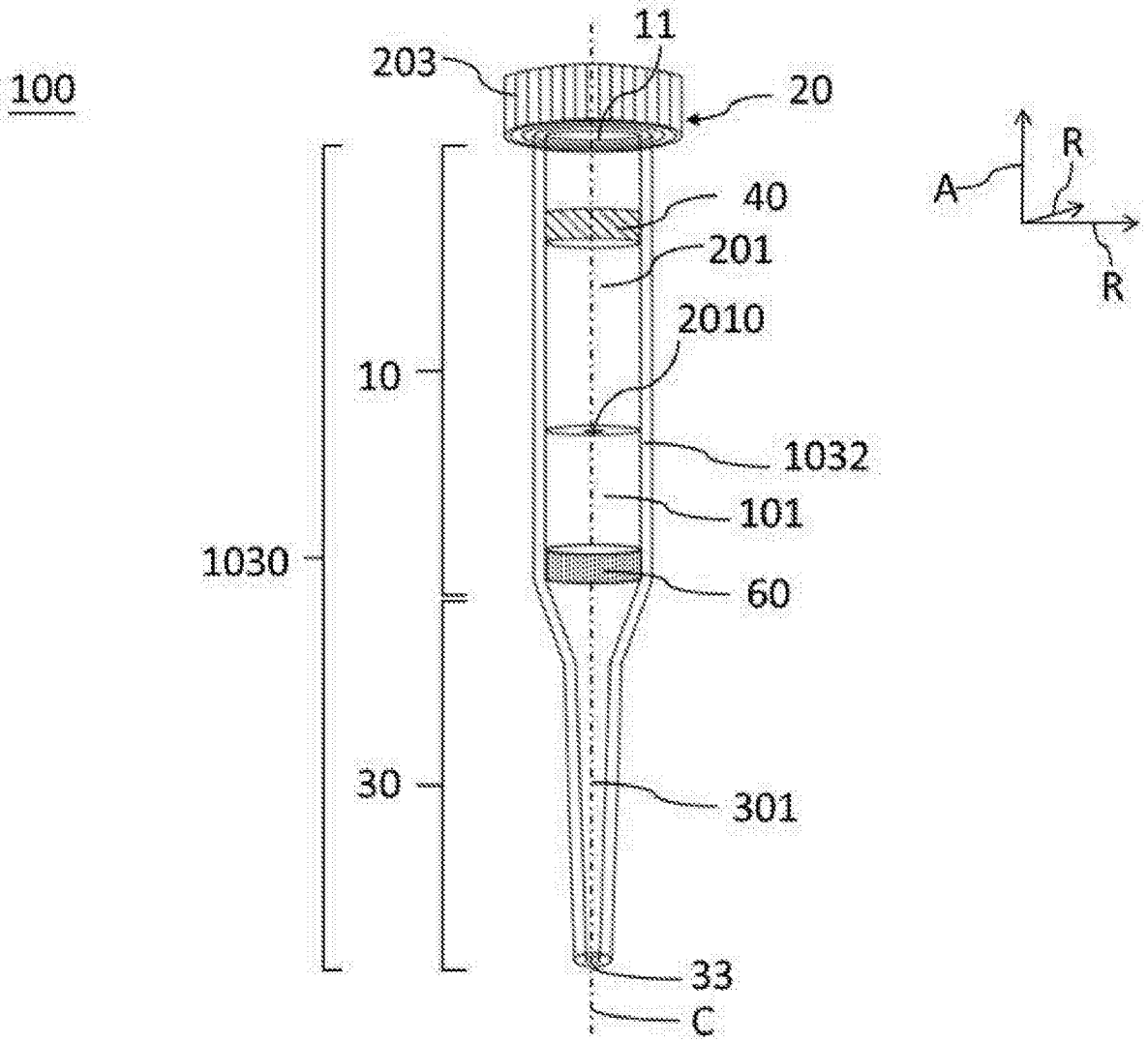


图2

100

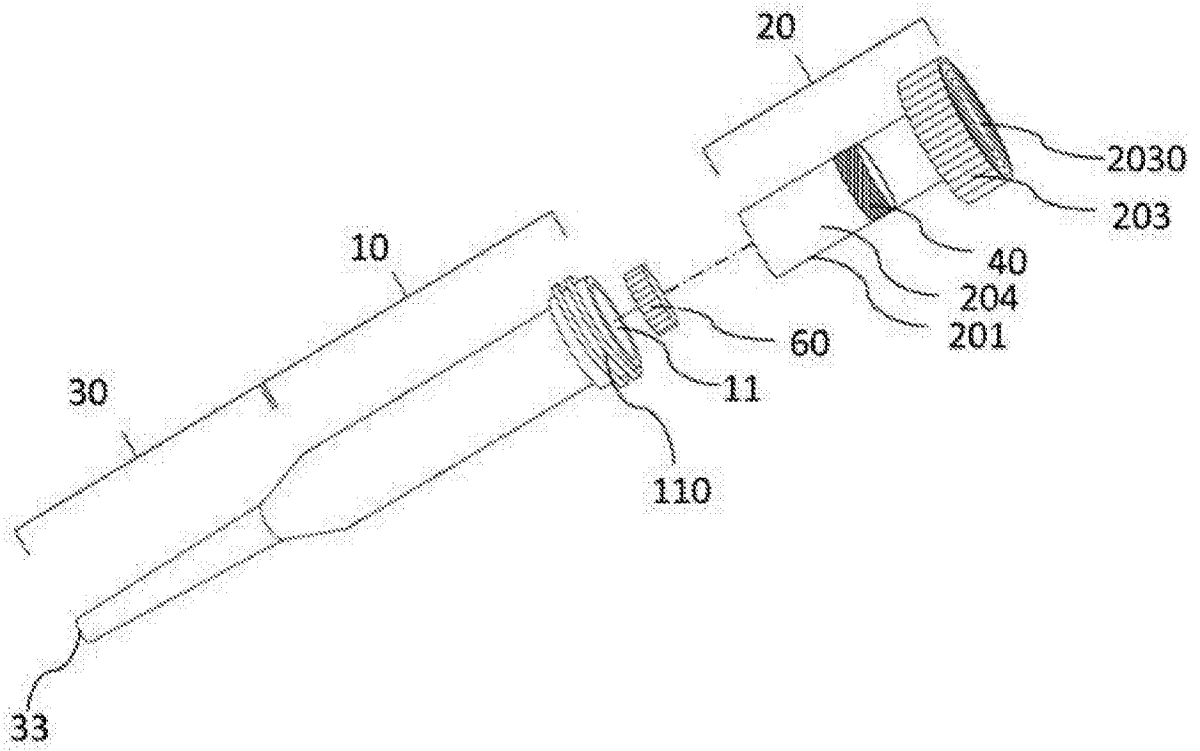


图3A

200

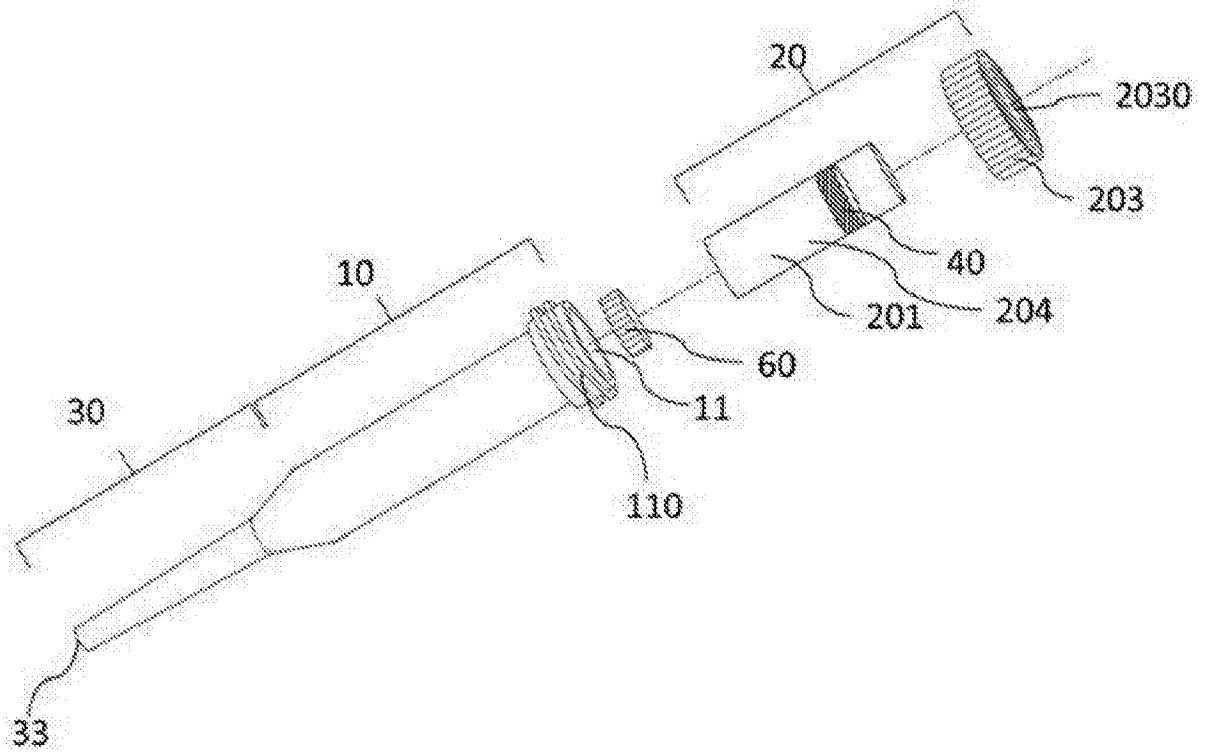


图3B

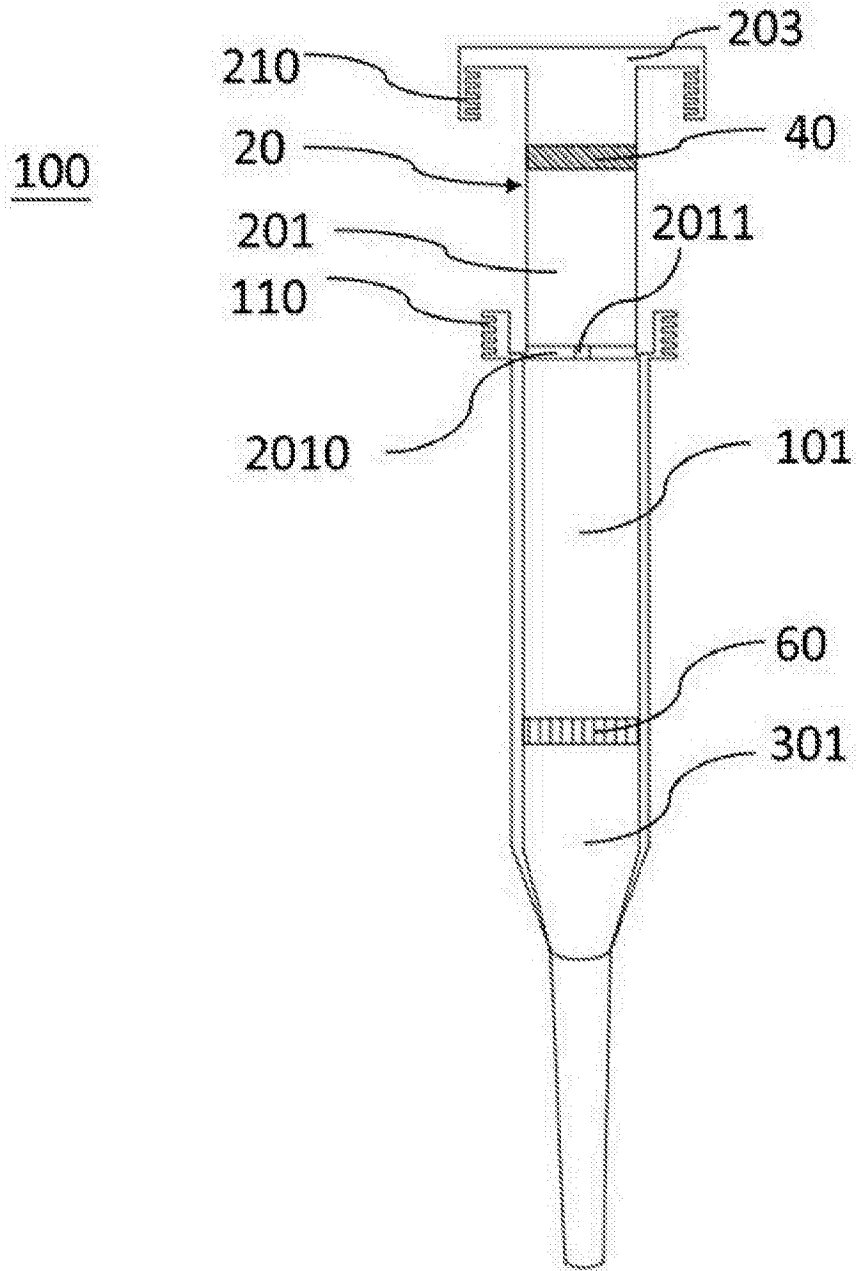


图4A

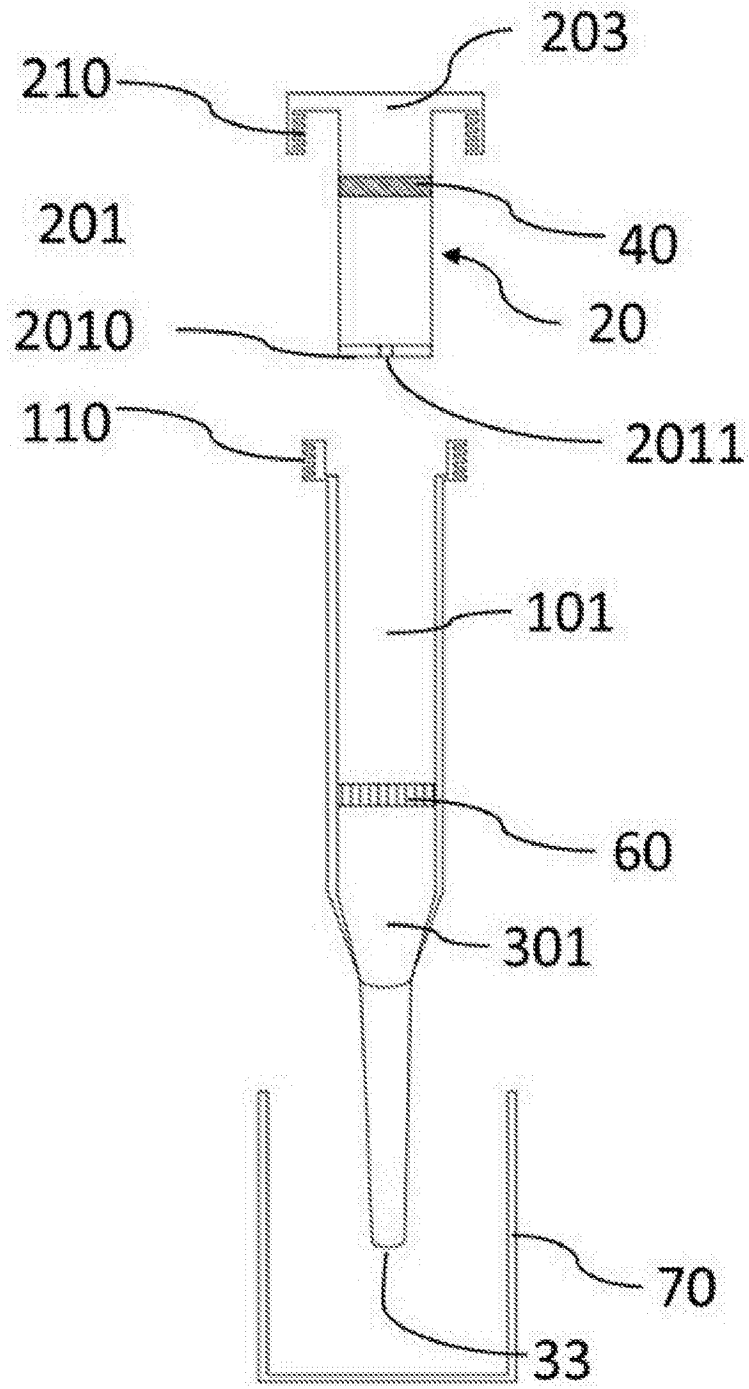


图4B

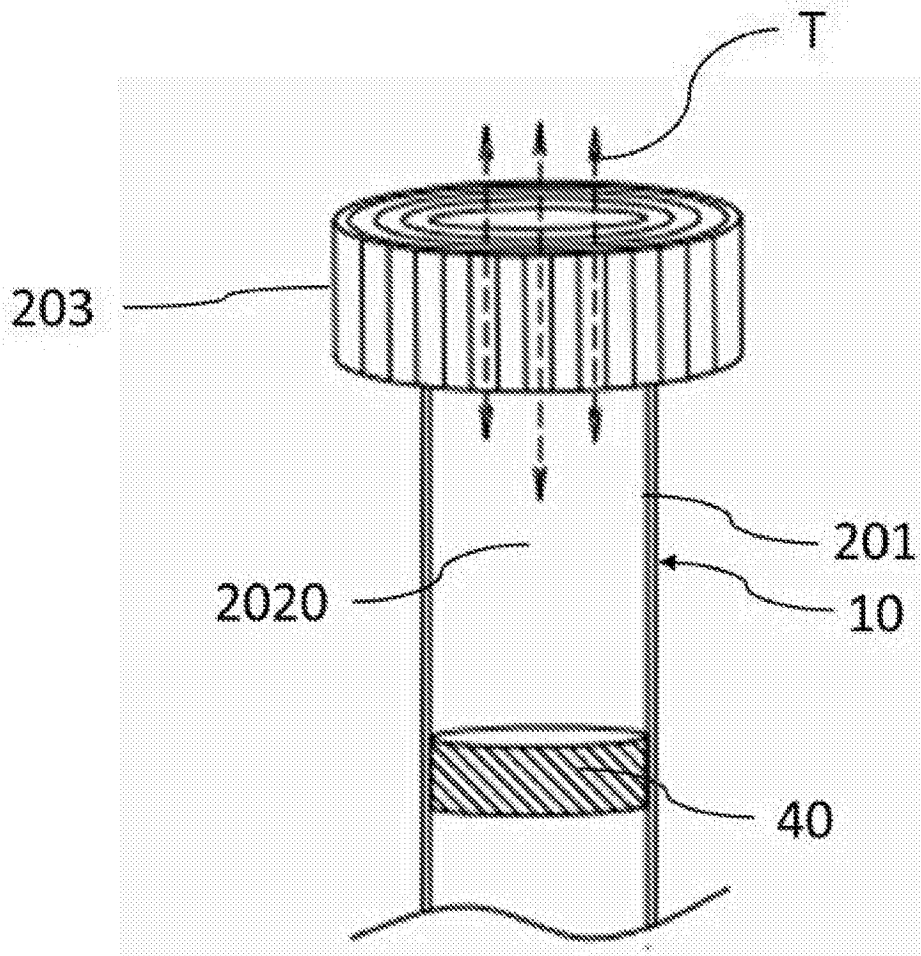


图5

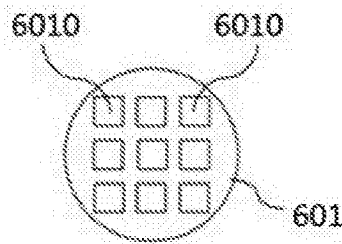


图6A

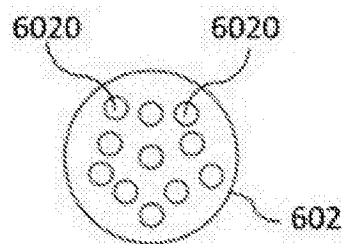


图6B

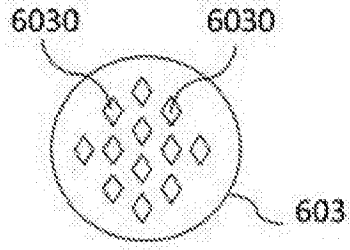


图6C

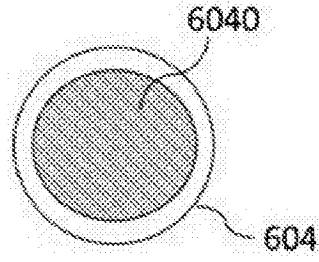


图6D

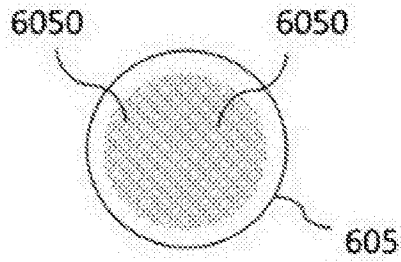


图6E

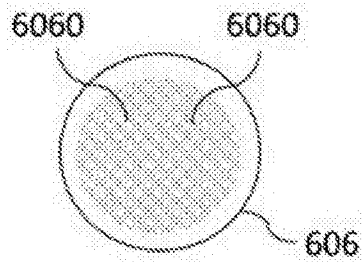


图6F

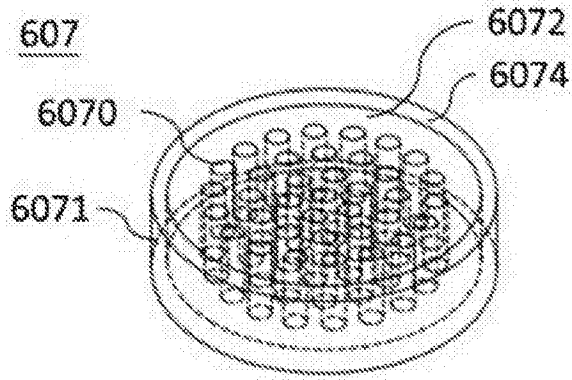


图7A

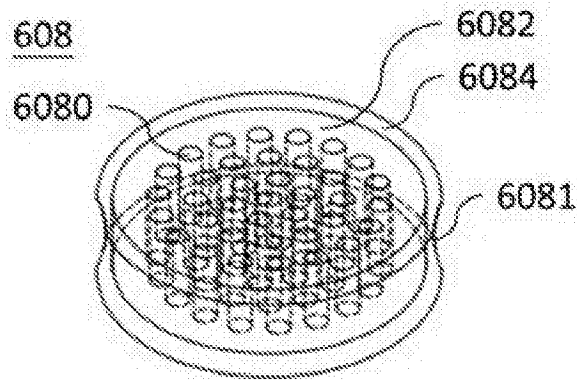


图7B

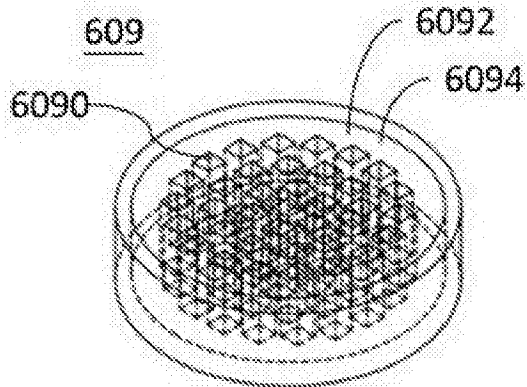


图7C

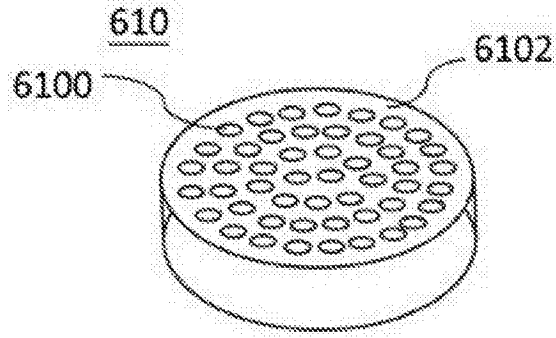


图7D

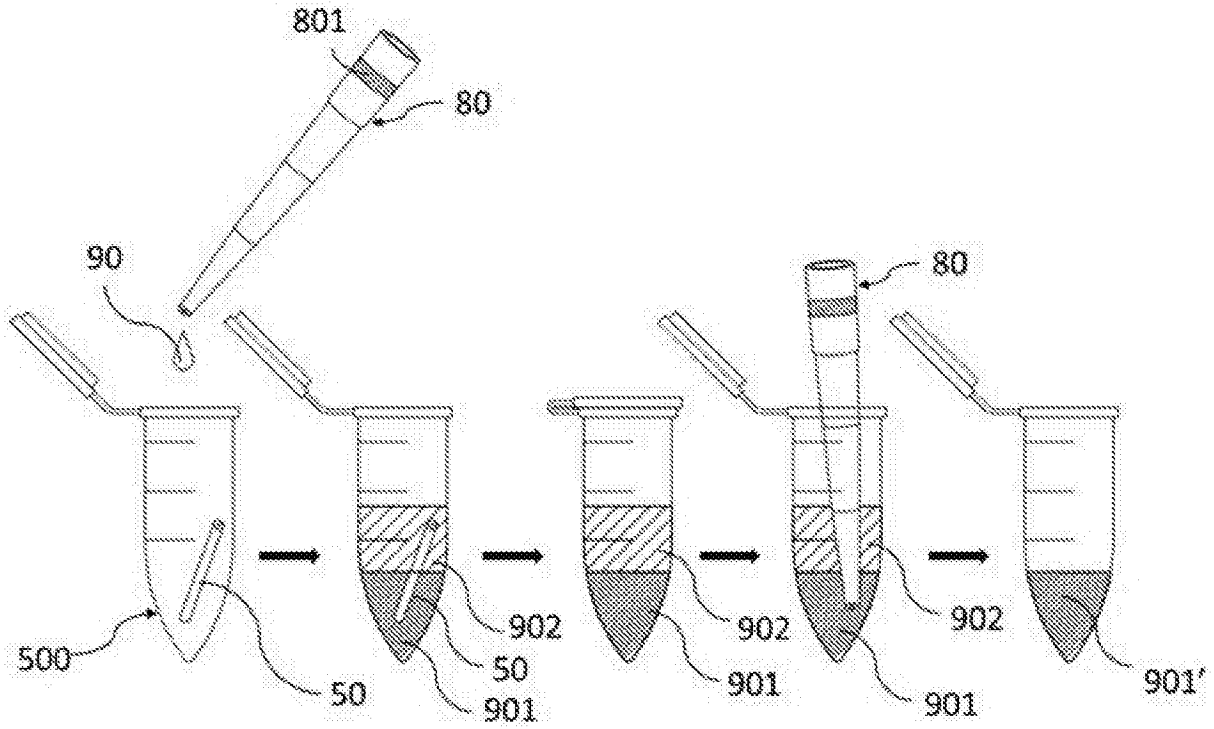


图8

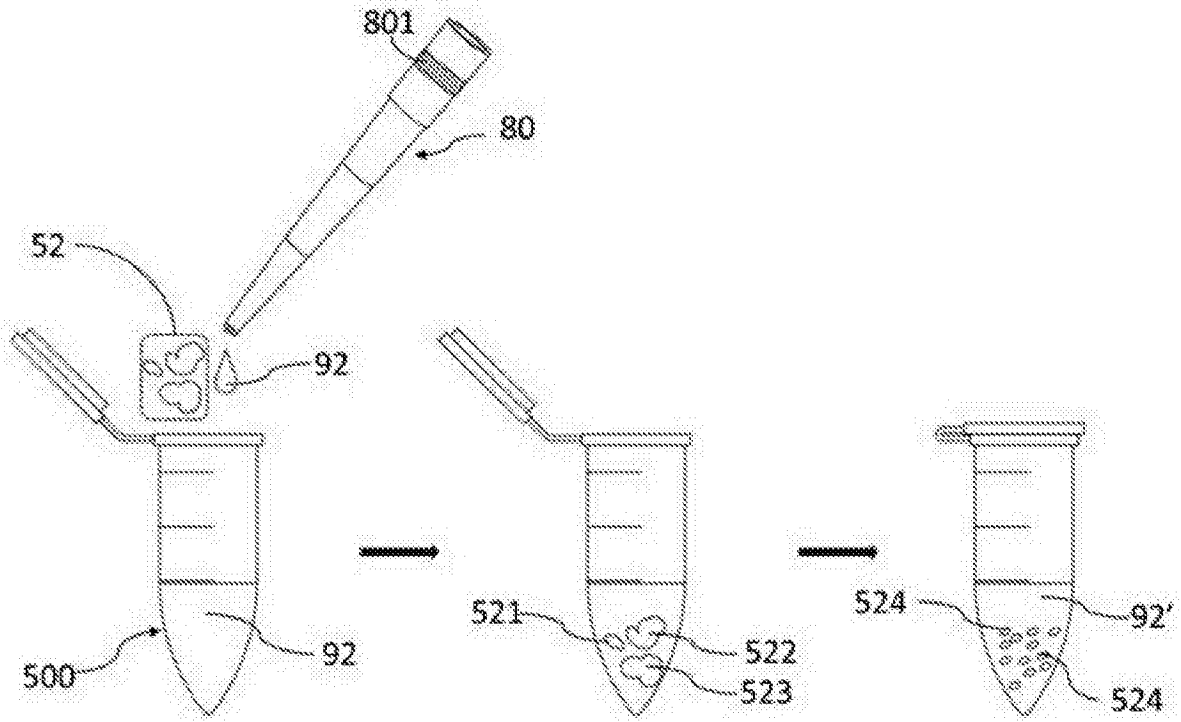


图9

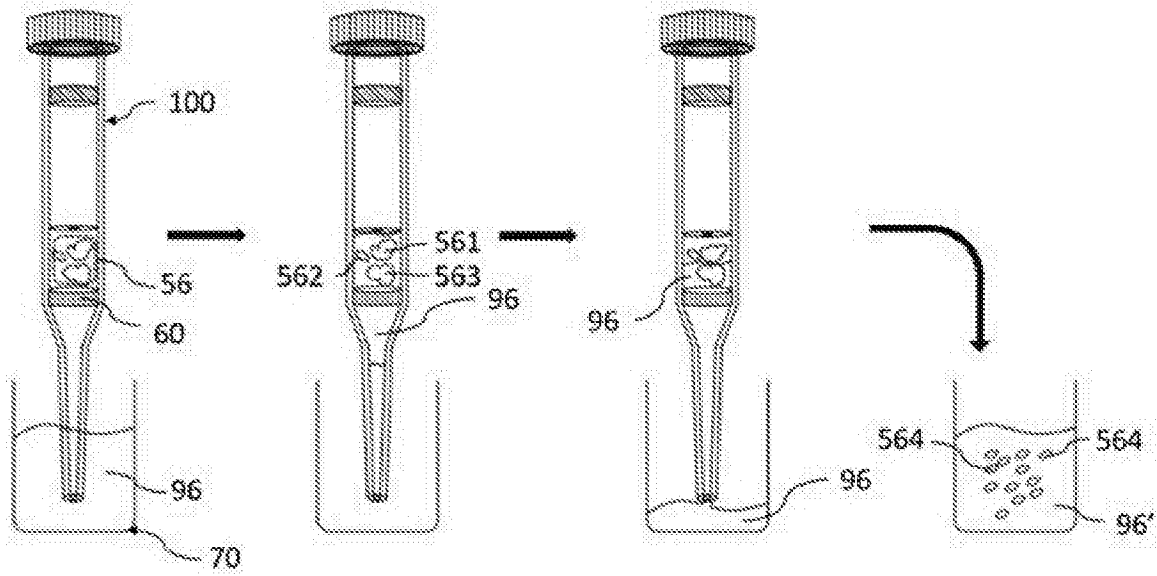


图10

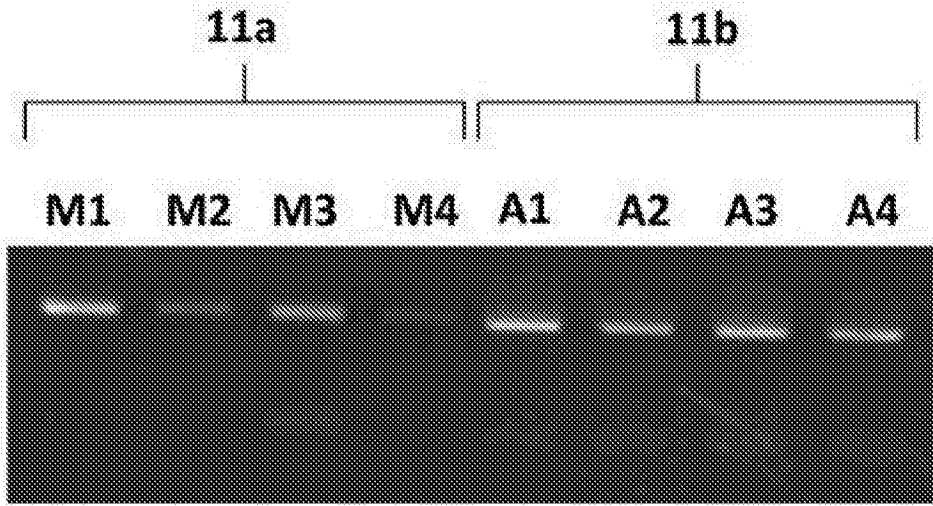


图11

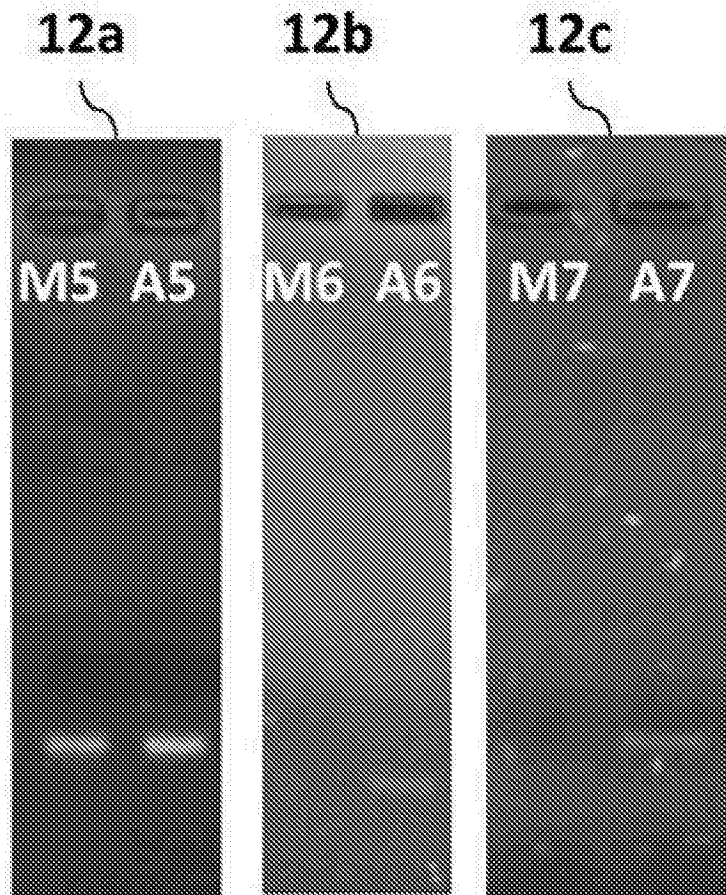


图12