



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107631977 A

(43)申请公布日 2018.01.26

(21)申请号 201710670087.7

(22)申请日 2017.08.08

(71)申请人 浙江理工大学

地址 310018 浙江省杭州市江干经济开发
区2号大街928号

(72)发明人 刘爱萍 陈本永 王夏华 吴化平
邢赟 许为中 周奇

(74)专利代理机构 杭州求是专利事务所有限公
司 33200

代理人 黄欢娣 邱启旺

(51)Int.Cl.

G01N 15/10(2006.01)

权利要求书1页 说明书6页 附图20页

(54)发明名称

一种三维石墨烯结构的细胞阻抗电极

(57)摘要

本发明提供一种三维结构石墨烯界面的单细胞阻抗电极,具有超高的单细胞传感灵敏度。与传统的金电极相比,细胞传感性能平均提高一倍。具体涉及金电极底座和位于电极底座上的石墨烯立体捕获微槽。根据单/双细胞的形状和尺寸,以及膜表面的丝状伪足,设计立体的捕获微槽,利用流体动力学,实现对单/双细胞的捕获。接着通过修饰在微槽表面的三维石墨烯薄膜电极,来实时定量采集单/双细胞在微运动(如细胞吸附,细胞迁移,细胞增殖和细胞凋亡)时的阻抗电信号,实现了不同癌变阶段单/双癌细胞的区分和病例检测,以及癌细胞不同生理行为(捕获、黏附、迁移、增殖分化、凋亡)的判断,为研究细胞生物学提供了新思路和新研究技术。

1. 一种三维结构石墨烯界面的单细胞阻抗电极,其特征在于,所述电极包括电极底座(1)和位于电极底座(1)上的捕获槽(2),所述捕获槽(2)由多个微电极组成,相邻的微电极之间具有 $5\mu\text{m}$ 的缝隙(3);多个微电极有序排列构成一个垂直于电极底座(1)的类弧形捕获面,弧线为沿短轴分割的半椭圆,短轴长度为 $16\text{-}20\mu\text{m}$,长轴长度为 $32\text{-}36\mu\text{m}$ 。

2. 一种三维结构石墨烯界面的双细胞阻抗电极,其特征在于,所述电极包括电极底座(1)和位于电极底座(1)上的捕获槽(2),所述捕获槽(2)由多个微电极组成,相邻的微电极之间具有 $5\mu\text{m}$ 的缝隙(3);多个微电极有序排列构成一个垂直于电极底座(1)的类弧形捕获面,弧线为沿短轴分割的半椭圆的弧形,短轴长度为 $27\text{-}33\mu\text{m}$,长轴长度为 $40\text{-}45\mu\text{m}$ 。

3. 根据权利要求1或2所述的细胞阻抗电极,其特征在于,所述捕获槽(2)由两个微电极组成。

4. 根据权利要求1或2所述的细胞阻抗电极,其特征在于,所述捕获槽(2)的高度为 $30\mu\text{m}$ 。

5. 根据权利要求1或2所述的细胞阻抗电极,其特征在于,所述电极底座(1)包括金层和位于金层上表面的石墨烯层,所述捕获结构的弧形捕获面覆盖有石墨烯层(4),石墨烯层(4)与金电极底座(1)导通。

6. 根据权利要求5所述的细胞电极,其特征在于,所述石墨烯层(4)具有和细胞表面的丝状伪足相匹配的微纳褶皱和纹理结构,用于增加细胞和电极材料之间的地形相互作用和纹理作用,显著的提高单细胞电信号。

7. 根据权利要求1或2所述的细胞电极,其特征在于,通过引线连接电极底座,将细胞传感信号传导进入阻抗仪并通过电脑显示。

一种三维石墨烯结构的细胞阻抗电极

技术领域

[0001] 本发明属于微流控单细胞捕获及传感领域,尤其涉及一种三维结构石墨烯界面的单细胞和双细胞阻抗电极。

背景技术

[0002] 细胞是生物体基本的结构和功能单位,细胞是最基本的生命系统。传统的细胞研究通常以大量细胞样本为对象,期望获得同类细胞的普遍性质。然而,同一类型的细胞之间也或多或少存在差异,由于细胞与细胞之间具有相互作用。这种分析实际上仅能提供细胞整体样本的平均响应,而忽略了单个细胞的详细信息。因此,设计一种单细胞阻抗电极,应用于对单个细胞传感性能的研究是至关重要的。

[0003] 微流控芯片技术是把生物、化学、医学分析过程的样品制备、反应、分离、检测等基本操作单元集成到一块微米尺度的芯片上。由于它在生物、化学、医学等领域的巨大潜力,已经发展成为一个生物、化学、医学、流体、电子、材料、机械学科交叉的崭新研究领域。近些年发展起来的微流控技术为细胞操控及分析提供了新的发展思路。基于微尺度下不同的物理化学原理,科学家已发展出具有各种功能和不同应用的微流控细胞芯片。目前,用于芯片上细胞分离和捕获的手段涉及光、电、声、磁、流体力学、机械加工以及化学方法等众多领域,主要分为接触式和非接触式两种。例如,光学手段是激光光镊技术与芯片技术的结合,它可实现单细胞捕获和操控,但其涉及仪器复杂,操控单一,捕获效率低。电学方法是与微流控芯片最成功的结合手段,有多种作用方式,如电渗、电泳、介电泳等方式。

[0004] 单个捕获微槽在研究细胞生物特性领域有独特的优势,尤其是研究单个细胞的生物学问题,可以避免细胞与细胞之间的相互作用,排除其他因素对细胞的影响。在制造捕获微槽的整个过程中,微槽的微结构设计和传感材料的选择至关重要。不同形状的捕获结构或者不同的传感材料,使得检测信号的大小有天壤之别。目前大多数电阻抗的传感电极都是经典的平面二维金电极结构,此电极与细胞的接触面积小,获取的细胞信号微弱,而且不能反映细胞在竖直方向上的微运动和迁移,因此不利于研究细胞生物学特性,尤其是单细胞。随着现代医学和生物科技的发展,越来越多的人工材料与器件应用于人体和生物体,例如生物检测器件,可植入材料,组织工程材料等。在这些应用中存在两个基本的科学问题:细胞与材料在界面上的相互作用,以及生物分子与材料在界面上的相互作用。在这些方面,生物体系中存在一些独特的机制来解决相互作用的问题,这为生物界面材料的研究带来了很多启示。因此根据单个细胞的形状结构尺寸,以及生理特性和生活的微环境设计具有三维石墨烯仿生界面的电极材料来研究单细胞的电学响应和性能具有特别明显的界面优势。

[0005] 对单个癌细胞的检测和研究越来越精准,不但要求区分不同的癌细胞,更加要求区别同一细胞的不同癌变阶段,甚至是同一癌变阶段细胞的各种不同的生理行为,来对癌症的病理和诊断治疗有指导作用。因此对电极材料传感性能的要求也越来越高。石墨烯作为目前发现的最薄、强度最大、导电导热性能最强的一种新型纳米材料,在研究细胞的电学相应方面有得天独厚的优势。更重要的是用蒸镀法修饰在微柱上的石墨烯薄膜具有微纳尺

寸的纳米纹理和褶皱,与单细胞表面的丝状伪足发生纹理和地形相互作用,可以显著的提高单细胞的传感性能。

发明内容

[0006] 本发明的目的在于针对现有技术的不足,提供一种三维结构石墨烯界面的细胞阻抗电极,用于单/双细胞的捕获及传感和阻抗监测。

[0007] 本发明的目的是通过以下技术方案实现的:一种三维结构石墨烯界面的单细胞阻抗电极,所述电极包括电极底座和位于电极底座上的捕获槽,所述捕获槽由多个微电极组成,相邻的微电极之间具有5 μ m的缝隙;多个微电极有序排列构成一个垂直于电极底座的类弧形捕获面,单细胞阻抗电极的弧线为沿短轴分割的半椭圆,短轴长度为16-20 μ m,长轴长度为32-36 μ m,双细胞阻抗电极的弧线为沿短轴分割的半椭圆的弧形,短轴长度为27-33 μ m,长轴长度为40-45 μ m。

[0008] 进一步地,所述捕获槽由两个微电极组成。

[0009] 进一步地,所述捕获槽的高度为30 μ m。

[0010] 进一步地,所述电极底座包括金层和位于金层上表面的石墨烯层,所述捕获结构的弧形捕获面覆盖有石墨烯层,石墨烯层与金电极底座导通。

[0011] 进一步地,所述石墨烯层具有和细胞表面的丝状伪足相匹配的微纳褶皱和纹理结构,用于增加细胞和电极材料之间的地形相互作用和纹理作用,显著的提高单细胞电信号。

[0012] 进一步地,通过引线连接电极底座,将细胞传感信号传导进入阻抗仪并通过电脑显示。

[0013] 本发明的有益效果在于:

[0014] (1) 电极具有一个和细胞大小、形状一致的弧面凹槽,显著的增大了细胞和电极的接触面积,与传统的平面金电极相比,将细胞和电极的接触从二维平面延伸到三维空间,使得采集到的电信号不但能够反应细胞水平方面的运动而且可以反应细胞垂直方向上的迁移。

[0015] (2) 石墨烯薄膜界面的纳米结构和纹理和细胞表面的丝状伪足微结构十分的一致,增大了细胞和电极之间的相互作用,从而使得传感性能和灵敏度有很大程度的提高,与传感的金电极相比传感性能平均提高了一倍;

[0016] (3) 狭缝的设计,允许细胞缓冲液流动,但不排出细胞,以确保微柱的弧形捕获区域不会积累太多的细胞缓冲液而影响细胞捕获效率。

[0017] (4) 本发明的电极可以多次循环使用,提高了利用率和成本,具有良好的应用前景。

附图说明

[0018] 图1为单细胞阻抗电极的结构示意图;

[0019] 图2为具有三维结构石墨烯界面的单细胞阻抗电极捕获细胞的效果图,具有微纳褶皱和纹理的石墨烯界面4清晰可见;

[0020] 图3为用有限元计算得到的捕获微柱内部和周围流速分布模拟图;

[0021] 图4为用有限元计算得到的捕获细胞后电场分布模拟图;

[0022] 图5为修饰石墨烯后单细胞电极的显微图片, (a) 俯视图、(b) 狭缝的放大图、(c) 微槽内壁的放大侧视图、(d) 微槽内壁的AFM(原子力显微镜)图;

[0023] 图6是对石墨烯微槽的特性表征, 包括 (a) 平面基底上氧化石墨烯和被还原成还原氧化石墨烯的拉曼表征, (b) 微柱基底上光刻胶和修饰石墨烯后的拉曼表征, (c) 氧化石墨烯膜和不同厚度的石墨烯膜的电阻测试, (d) 氧化石墨烯膜和石墨烯膜的伏安特性曲线。

[0024] 图7为石墨烯界面捕获单细胞后的显微照片;

[0025] 图8为石墨烯界面捕获双细胞后的显微照片;

[0026] 图9为单个转移性强的乳腺癌细胞 (MDA-MB-231) 在2D金界面和3D石墨烯界面上不同接种阶段的伯德阻抗谱和相位谱。(a、b) 分别是癌变中期乳腺癌细胞接种在金界面上各个生理行为, 包括: 空载、捕获、贴附 (培养2h)、迁移 (培养5h) 和增殖 (培养9h) 等, 的伯德阻抗谱和相位谱, (c、d) 是相应石墨烯界面的情况。

[0027] 图10为单个转移性弱的乳腺癌细胞 (MCF-7) 在2D金界面和3D石墨烯界面上不同接种阶段的伯德阻抗谱和相位谱。(a、b) 分别是癌变中期乳腺癌细胞接种在金界面上各个生理行为, 包括: 空载、捕获、贴附 (培养2h)、迁移 (培养5h) 和增殖 (培养9h) 等, 的伯德阻抗谱和相位谱, (c、d) 是相应石墨烯界面的情况。

[0028] 图11为两个转移性强的乳腺癌细胞 (MDA-MB-231) 在2D金界面和3D石墨烯界面上不同接种阶段相互作用的伯德阻抗谱和相位谱。(a、b) 分别是癌变中期乳腺癌细胞接种在金界面上各个生理行为, 包括: 空载、捕获、贴附 (培养2h)、迁移 (培养5h) 和增殖 (培养9h) 等, 的伯德阻抗谱和相位谱, (c、d) 是相应石墨烯界面的情况。

[0029] 图12是将单个转移性弱的乳腺癌细胞 (MCF-7) 接种在2D金界面和本发明的 3D石墨烯界面上不同接种阶段, 包括: 空载、捕获、贴附 (培养2h)、迁移 (培养5h) 和增殖 (培养9h) 等的五次重复实验阻抗幅值做统计分析得到结果 (图示是五次重复实验的均值±方差)。

[0030] 图13是将单个转移性强的乳腺癌细胞 (MDA-MB-231) 接种在2D金界面和本发明的 3D石墨烯界面上不同接种阶段, 包括: 空载、捕获、贴附 (培养2h)、迁移 (培养5h) 和增殖 (培养9h) 等的五次重复实验阻抗幅值做统计分析得到结果 (图示是五次重复实验的均值±方差)。

[0031] 图14为两个转移性弱的乳腺癌细胞 (MCF-7) 在2D金界面和3D石墨烯界面上不同接种阶段相互作用的伯德阻抗谱和相位谱。

[0032] 图中, 电极底座1、捕获槽2、缝隙3、石墨烯层4。

具体实施方式

[0033] 如图1所示, 一种三维结构的单细胞阻抗电极, 包括电极底座1和位于电极底座1上的捕获槽2, 所述捕获槽2由多个微电极组成, 相邻的微电极之间具有5 μ m的缝隙3; 多个微电极有序排列构成一个垂直于电极底座1的类弧形捕获面, 其弧线为沿短轴分割的半椭圆, 短轴长度为16-20 μ m, 长轴长度为32-36 μ m。其中, 捕获槽2的形状结构和尺寸是根据单细胞的形貌大小和生物特性量身定做的, 具有一个和细胞大小、形状一致的弧面凹槽, 最大限度的增加了细胞膜和电极材料作用的接触点和接触力。与传统的平面金电极相比, 将细胞和电极的接触从二维平面延伸到三维空间, 使得采集到的电信号不但能够反应细胞水平方面的运动而且可以反应细胞垂直方向上的迁移。而狭缝3的设计, 允许细胞缓冲液流动, 但不排

出细胞,以确保微柱的弧形捕获区域不会积累太多的细胞缓冲液而影响细胞捕获效率。

[0034] 所述电极底座1包括金层和位于金层上表面的石墨烯层,所述捕获结构的弧形捕获面覆盖有石墨烯层4,构成三维石墨烯仿生界面。作为优选的技术方案,石墨烯层4具有和细胞表面的丝状伪足相匹配的微纳褶皱和纹理结构,该优化的三维石墨烯仿生界面的阻抗电极捕获单细胞的效果如图2所示,具有和细胞表面的丝状伪足相匹配的微纳褶皱和纹理结构的石墨烯层,增加了细胞和电极材料之间的地形相互作用和纹理作用,显著的提高单细胞电信号。

[0035] 通过有限元计算 (COMSOL软件) 的方法模拟上述三维阻抗电极的流速分布和捕获细胞前后的电场分布,流速分布模拟结果如图3所示,从速度分布的模拟结果可以看出,弧形凹槽的捕获区的流速远小于侧间隙。由于每个弧形凹槽的内部空间仅能容纳一个细胞,并且捕获区和外部狭缝之间的速度差,所以设计的捕获结构捕获细胞概率可以证明为100%。电场分布计算时电极、细胞以及溶液的介电常数和电导率如表1所示,电场分布的计算结果在图4中,最中间没有捕获细胞的凹槽电场基本为0,两侧捕获细胞的凹槽电场有明显的增强,说明制作的电极可以很有效传感单细胞的信号,并且增加的电场转化为电极增加的电阻抗,这与实验现象保持一致。

[0036] 表1

[0037]

Parameters	Values
cell diameter	20 μ m
cellrelative permittivity	200
cell conductivity	0.84S/m
medium relative permittivity	80
medium conductivity	0.01S/m
graphene relative permittivity	4.5
graphene conductivity	6.5S/m

[0038] 图5为修饰石墨烯后的阻抗电极的显微图片。(a)图是单细胞阻抗电极的全貌显微图,可以看出石墨烯薄膜连续而且均匀的修饰在捕获微槽的表面;(b)图是微槽狭缝放大的显微照片,可以看到有明显的表面纹理;(c)是微槽内侧放大的显微侧视图,同样可以看到有明显的表面微纳纹理,从原子力显微镜证明了微柱内壁的粗糙形貌(d),微槽表面石墨烯的微纳纹理和细胞膜的丝状伪足发生地形和纹理相互作用,增大了细胞和电极之间的相互作用,从而使得传感性能和灵敏度有个很大程度的提高。实验证明,与传感的金电极相比,该石墨烯修饰的电极的传感性能平均提高了一倍。

[0039] 图6是微槽的性能表征,包括拉曼、四探针电阻、伏安特性曲线。(a)和(b)分别是平面和微柱位置的拉曼测试,表明氧化石墨烯已经连续的修饰在平面和微柱上,并被还原;(c)是用四探针法测得氧化石墨烯和不同厚度的还原氧化石墨烯薄膜的电导性,其中2 μ m厚的还原氧化石墨烯的电阻达到千欧,基本可以传感单个细胞的信号;(d)是氧化石墨烯和石墨烯薄膜的循环伏安曲线测试,氧化石墨烯基本没有电化学反应,而石墨烯膜有明显的氧化还原峰,证明制备得到的石墨烯微柱具有很好的电化学反应活性。

[0040] 图7为单细胞捕获在金界面和石墨烯界面凹槽上的显微照片。(a)是金界面捕获单

细胞;细胞捕获在石墨烯界面上后,细胞会被石墨烯微柱的凹槽紧紧的包裹(b)并且和微柱内壁有明显的挤压接触并产生一定数量的细胞丝状伪足(c)。

[0041] 图8为双细胞捕获在金界面和石墨烯界面凹槽上的显微照片。(a)是金界面捕获双细胞;细胞捕获在石墨烯界面上后,细胞会被石墨烯微柱的凹槽紧紧的包裹(b)并且和微柱内壁有明显的挤压接触并产生一定数量的细胞丝状伪足(c)。

[0042] 图9为单个转移性强的乳腺癌细胞(MDA-MB-231)在2D金界面和本发明的3D石墨烯界面上不同接种阶段,包括:空载、捕获、贴附(培养2h)、迁移(培养5h)和增殖(培养9h)等的伯德阻抗谱和相位谱。(a、b)分别是癌变中期乳腺癌细胞接种在金界面上各个生理行为的伯德阻抗谱和相位谱,(c、d)是相应石墨烯界面的情况,由图可知,石墨烯界面的阻抗值和相位值都比金界面的高,更重要的是石墨烯界面上各条曲线间距更大,证明细胞每种生理行为在石墨烯界面上反应的更为强烈。

[0043] 图10为单个转移性弱的乳腺癌细胞(MCF-7)在2D金界面和本发明的3D石墨烯界面上不同接种阶段,包括:空载、捕获、贴附(培养2h)、迁移(培养5h)和增殖(培养9h)等的伯德阻抗谱和相位谱。(a、b)分别是癌变初期乳腺癌细胞接种在金界面上各个生理行为的伯德阻抗谱和相位谱,(c、d)是相应石墨烯界面的情况,由图可知,石墨烯界面的阻抗值和相位值都比金界面的高,更重要的是石墨烯界面上各条曲线间距更大,证明细胞每种生理行为在石墨烯界面上反应的更为强烈。说明初期的乳腺癌细胞,也有一样的规律和效果。

[0044] 图11为两个转移性强的乳腺癌细胞(MDA-MB-231)在2D金界面和本发明的3D石墨烯界面上不同接种阶段,包括:空载、捕获、贴附(培养2h)、迁移(培养5h)和增殖(培养9h)等相互作用的伯德阻抗谱和相位谱。(a、b)分别是癌变中期乳腺癌细胞接种在金界面上各个生理行为的伯德阻抗谱和相位谱,(c、d)是相应石墨烯界面的情况,由图可知,石墨烯界面的阻抗值和相位值都比金界面的高,更重要的是石墨烯界面上各条曲线间距更大,证明每种生理行为下细胞之间的相互作用在石墨烯界面上反应的更为强烈。

[0045] 图12是将单个转移性弱的乳腺癌细胞(MCF-7)接种在2D金界面和本发明的3D石墨烯界面上不同接种阶段,包括:空载、捕获、贴附(培养2h)、迁移(培养5h)和增殖(培养9h)等的五次重复实验阻抗幅值做统计分析得到结果(图示是五次重复实验的均值±方差)。由统计图可知,在5KHz和10KHz的频率下,石墨烯界面的阻抗值都比金界面的高一倍多,而且在单细胞各种不同的生理行为下,石墨烯界面的采集到的阻抗变化也比金界面高很多。

[0046] 图13是将单个转移性强的乳腺癌细胞(MDA-MB-231)接种在2D金界面和本发明的3D石墨烯界面上不同接种阶段,包括:空载、捕获、贴附(培养2h)、迁移(培养5h)和增殖(培养9h)等的五次重复实验阻抗幅值做统计分析得到结果(图示是五次重复实验的均值±方差)。由统计图可知,MDA-MB-231和MCF-7具有一样的规律性。

[0047] 图14是将两个转移性弱的乳腺癌细胞(MCF-7)接种在2D金界面和本发明的3D石墨烯界面上不同接种阶段,包括:空载、捕获、贴附(培养2h)、迁移(培养5h)和增殖(培养9h)等的相互作用五次重复实验阻抗幅值做统计分析得到结果(图示是五次重复实验的均值±方差)。由统计图可知,在5KHz和10KHz的频率下,石墨烯界面的阻抗值都比金界面的高一倍多,而且在细胞各种不同的生理行为下,石墨烯界面的采集到的阻抗变化也比金界面高很多。

[0048] 表2为本发明的石墨烯界面比金界面的测量细胞每种生理行为变化的增加率。由

图可知单细胞的增加率约为100%。

[0049] 表3为本发明的石墨烯界面和金界面在单个乳腺癌细胞癌变引起的阻抗差值。由图可知,石墨烯界面比金界面高约3000欧。

[0050] 表4显示了本发明的石墨烯界面比金界面的测量细胞每种生理行为变化时两细胞相互作用的增加率。可知双细胞的增加率约为50%。

[0051] 表5显示了本发明的石墨烯界面和金界面在两个乳腺癌细胞癌变引起的阻抗差值。可知,石墨烯界面比金界面高约2000欧。

[0052] 表2

[0053]

percentage of increase in impedance change ($Z_{\text{cell-graphene}} - Z_{\text{cell-Au}}$)/ $Z_{\text{cell-Au}}$ (%)			no-loading	capture	adhesion	spreading	proliferation
single cell	MDA-MA-231	5KHz	20.70%	97.60%	83.90%	82.30%	80.40%
		10KHz	21.60%	58.20%	110.20%	121.10%	65.40%
	MCF-7	5KHz	17.70%	89.50%	100.30%	82.20%	74.70%
		10KHz	18.80%	135.60%	68.40%	56.60%	80.60%

[0054] 表3

[0055]

difference in impedance change ($Z_{\text{MCF-7}} - Z_{\text{MDA-MB-231}}$)(Ω)			capture	adhesion	spreading	proliferation
3D graphene interface	single cell	5KHz	8843	8445	5687	8560
		10KHz	7611	5867	4747	7233
2D Au interface	single cell	5KHz	5058	5002	3162	5436
		10KHz	2177	2274	2471	2893

[0056] 表4

[0057]

percentage of increase in impedance change ($Z_{\text{cell-graphene}} - Z_{\text{cell-Au}}$)/ $Z_{\text{cell-Au}}$ (%)			no-loading	capture	adhesion	spreading	proliferation
double cells	MDA-MA-231	5KHz	22.70%	48.80%	40.70%	39.80%	32.50%
		10KHz	29.40%	48.10%	35.00%	37.20%	31.00%
	MCF-7	5KHz	20.20%	54.70%	41.10%	48.40%	42.10%
		10KHz	22.90%	51.00%	47.30%	62.00%	58.00%

[0058] 表5

[0059]

difference in impedance change ($Z_{\text{MCF-7}} - Z_{\text{MDA-MB-231}}$)(Ω)			capture	adhesion	spreading	proliferation
3D graphene interface	double cells	5KHz	4201	5222	3749	4279
		10KHz	2462	2684	2084	2812
2D Au interface	double cells	5KHz	1186	1371	1557	1881
		10KHz	683	712	873	1137

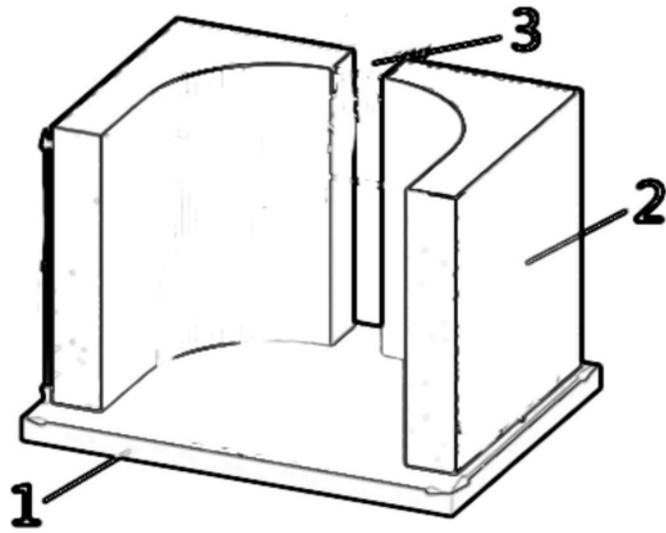


图1

微槽

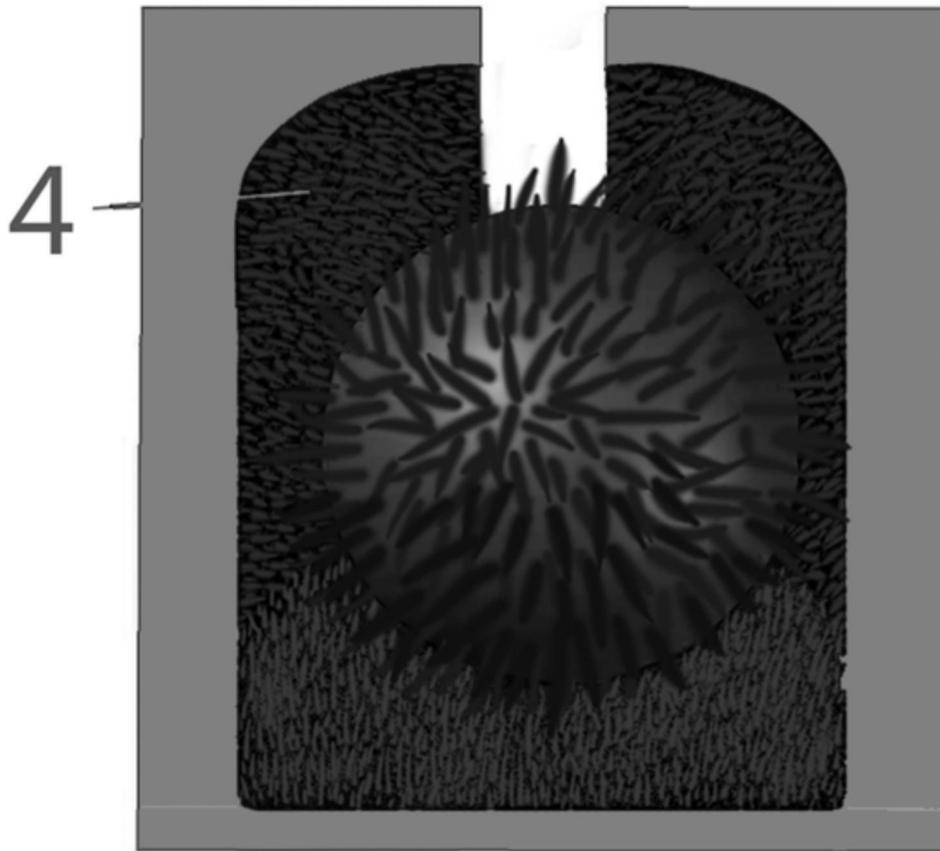


图2

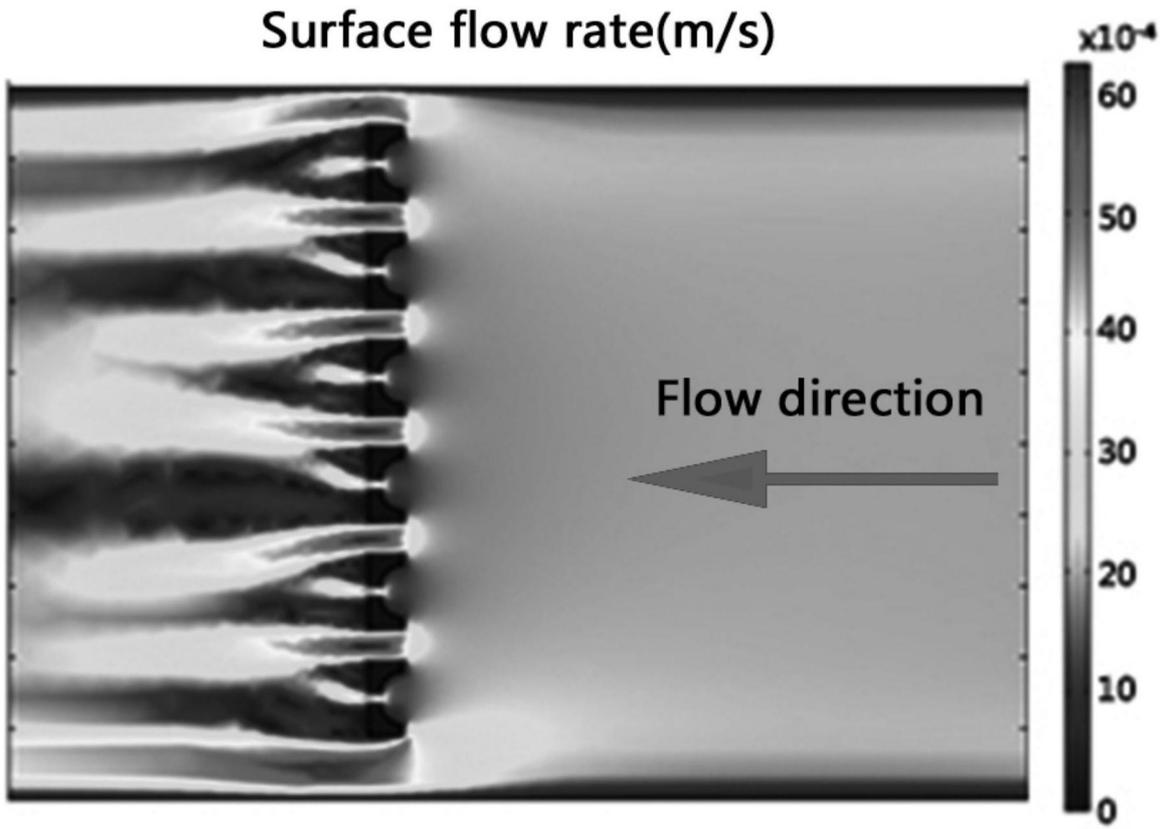


图3

Electric field norm (V/m)

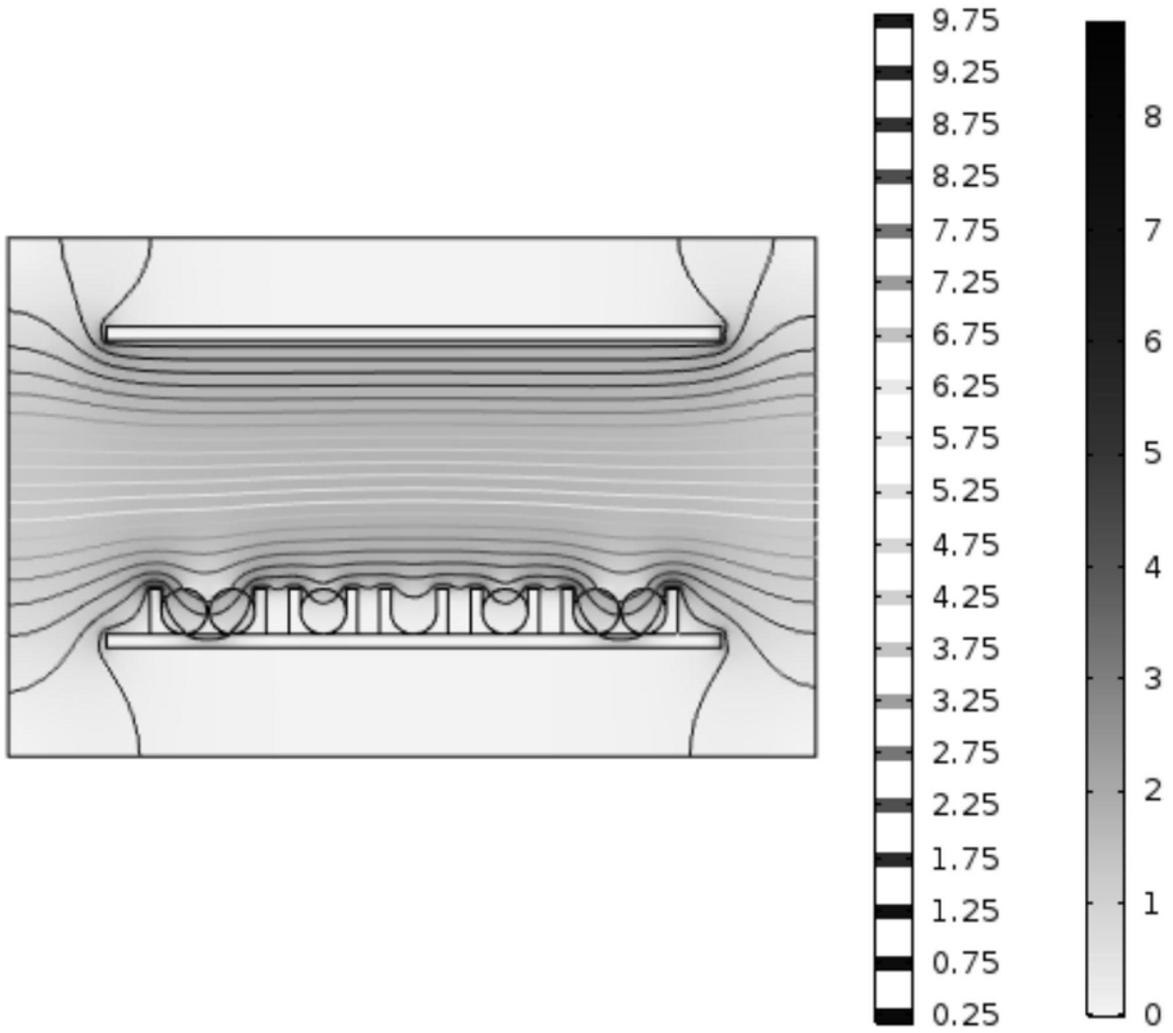


图4

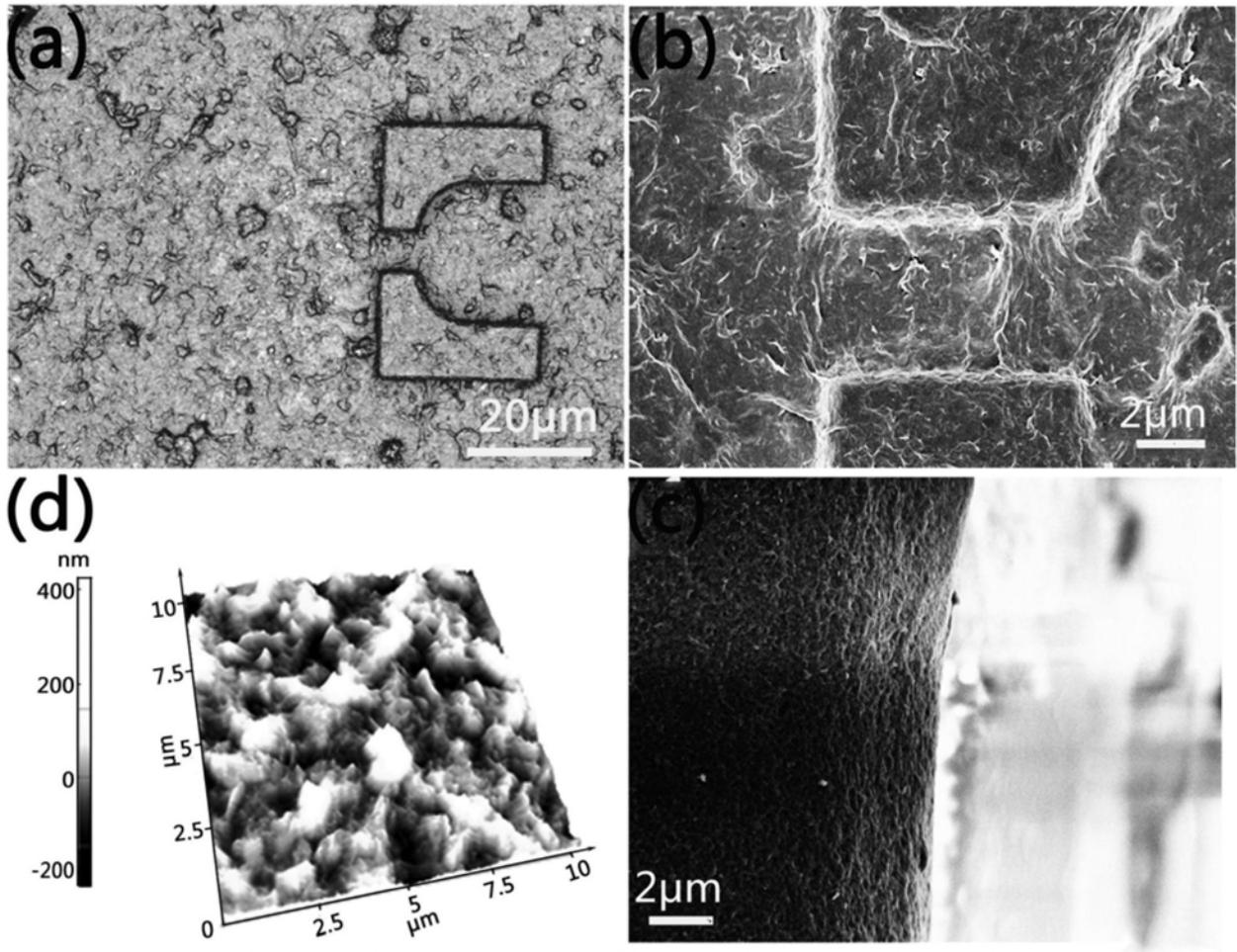


图5

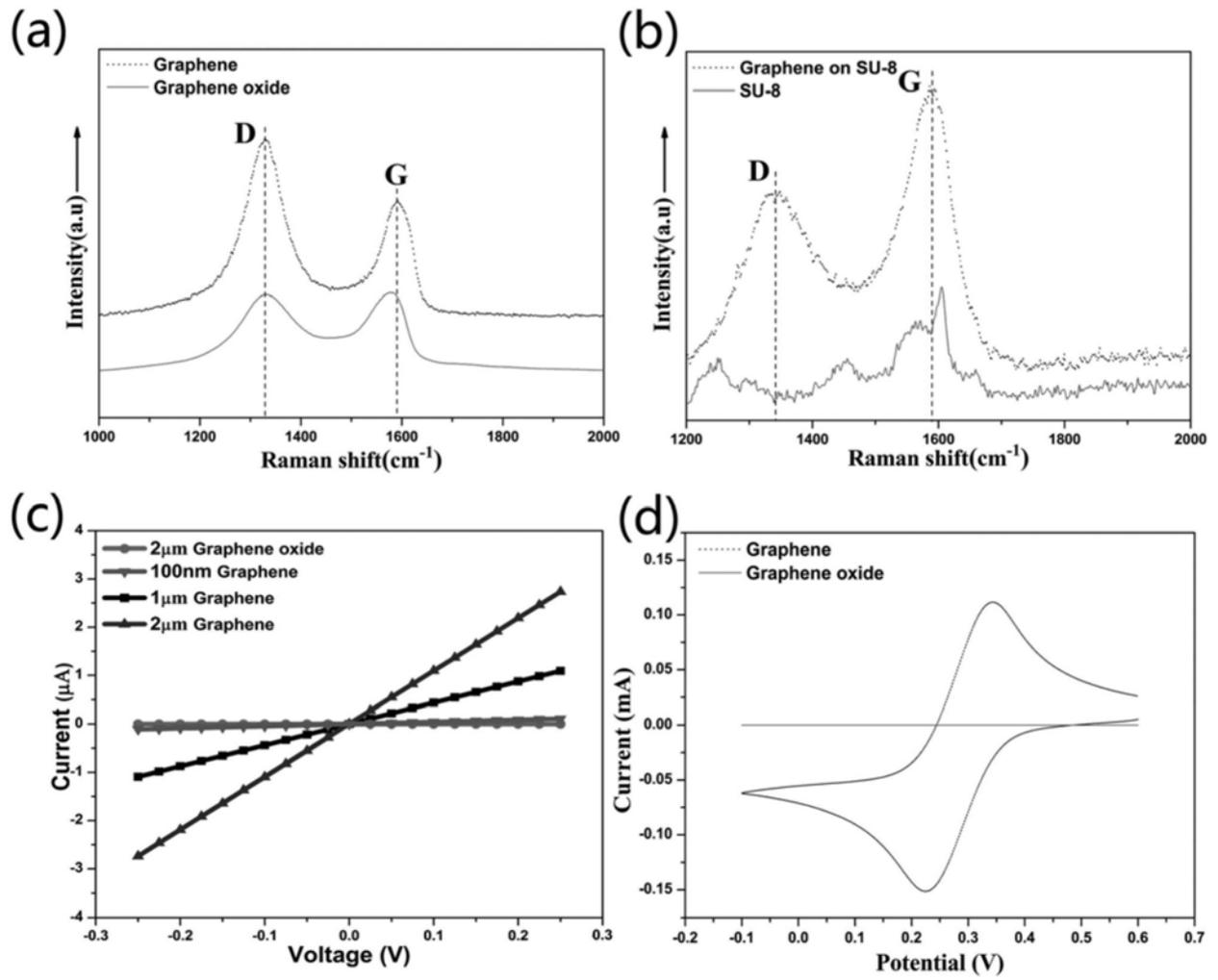


图6

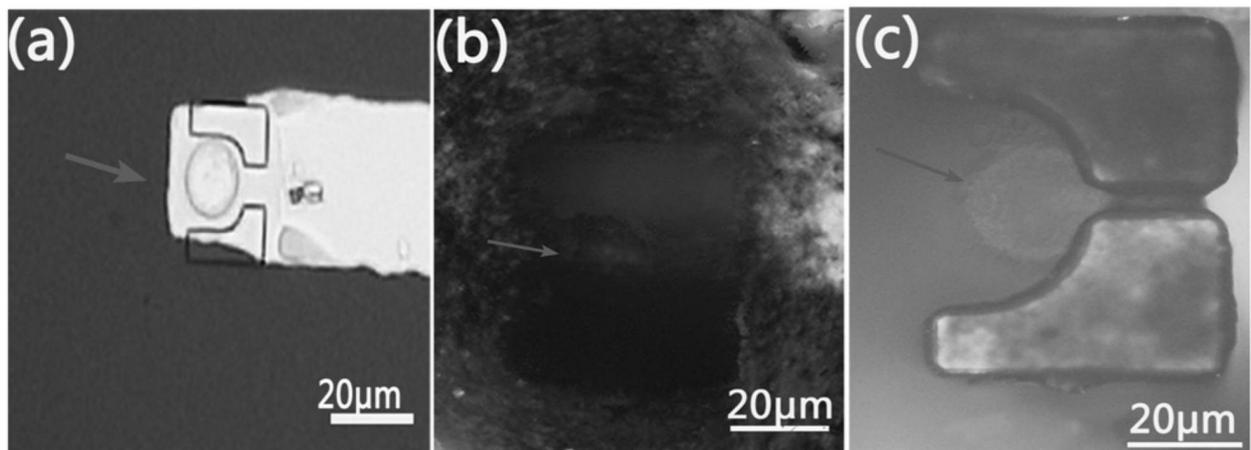


图7

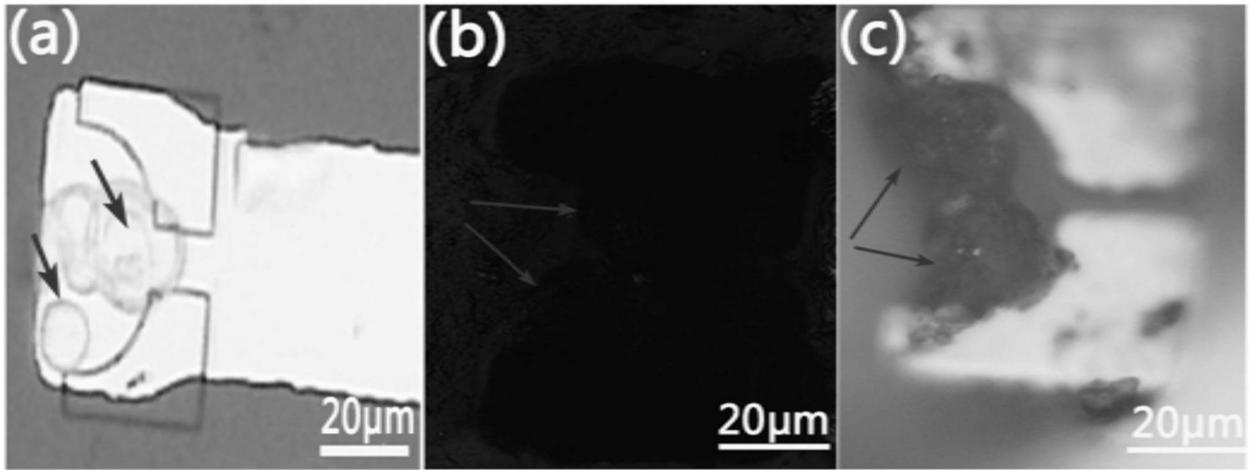


图8

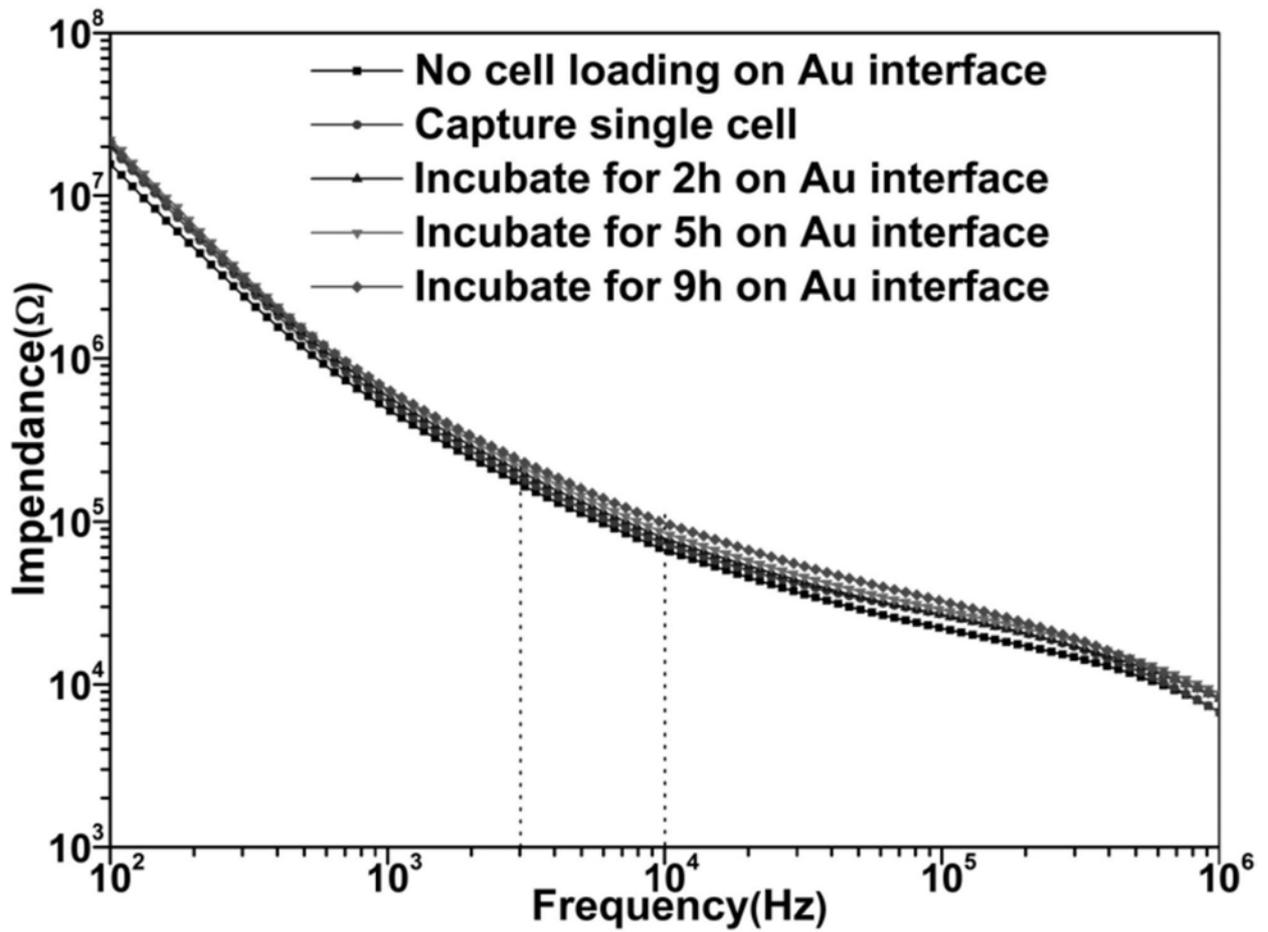


图9a

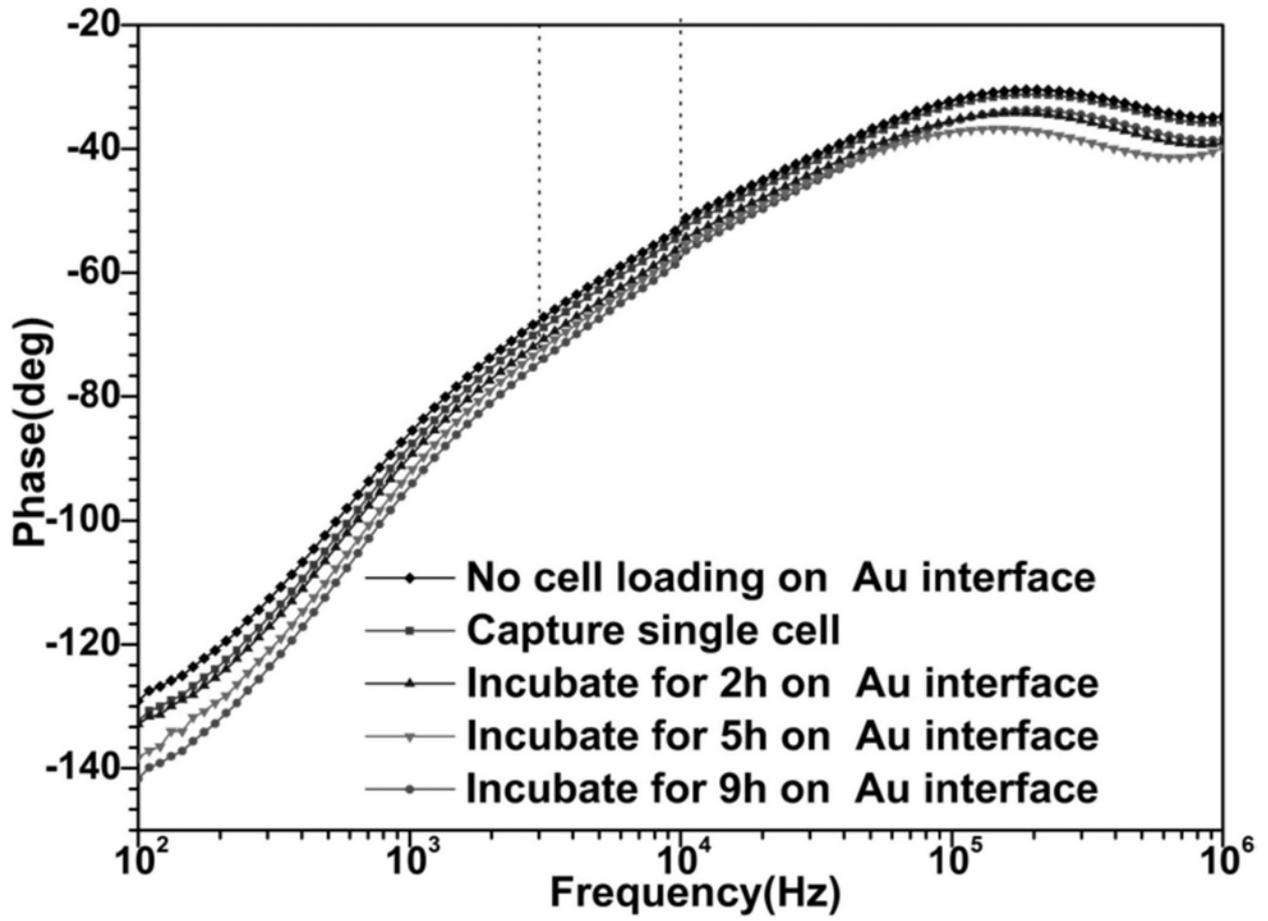


图9b

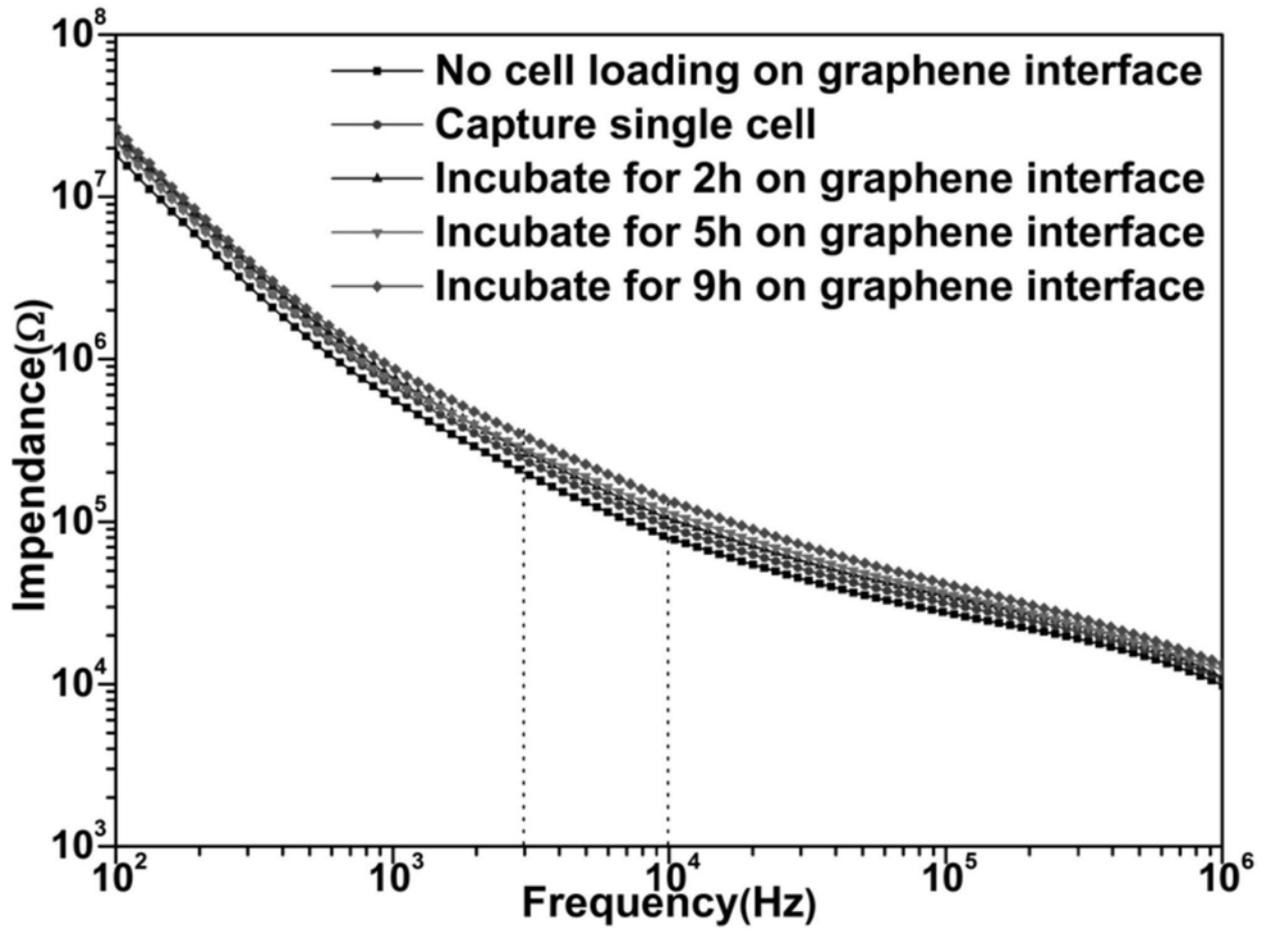


图9c

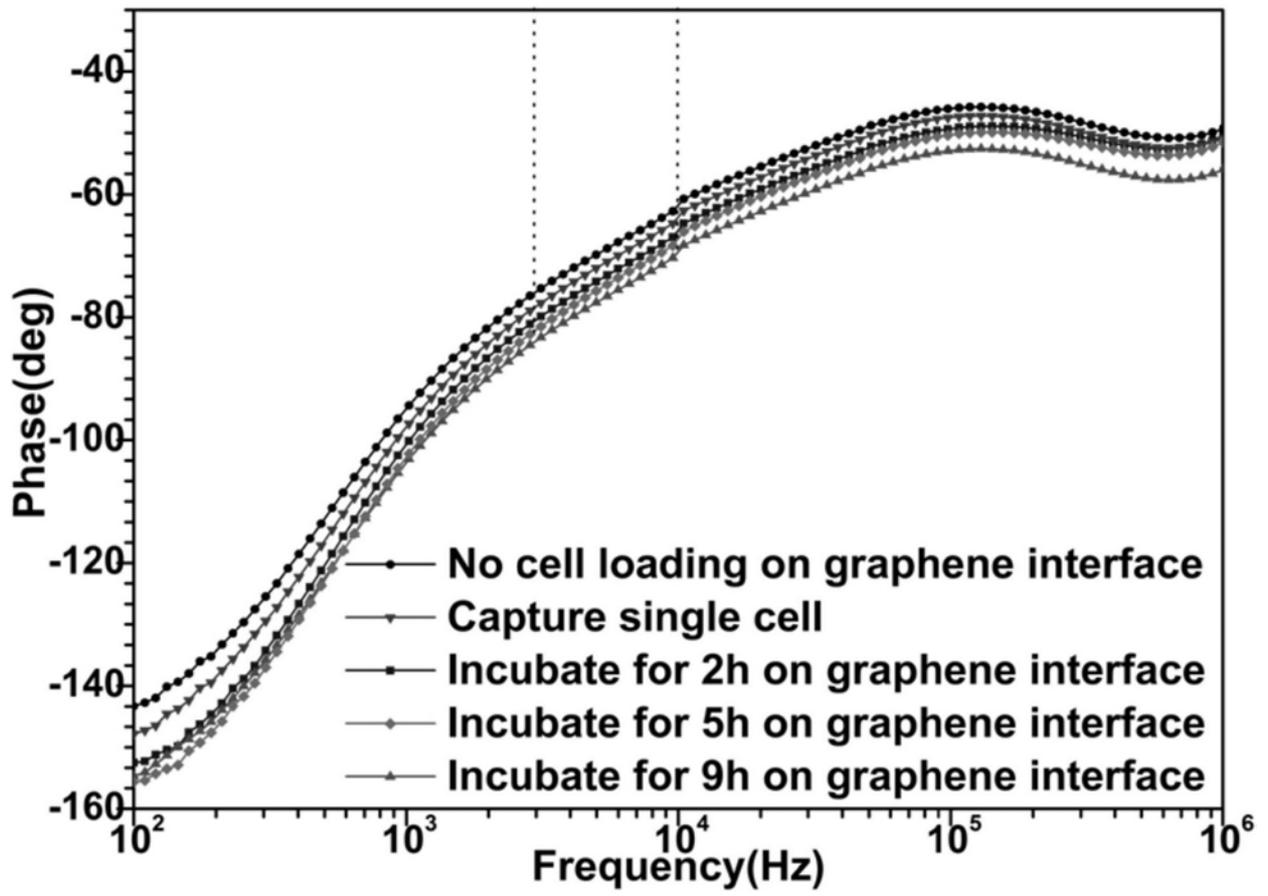


图9d

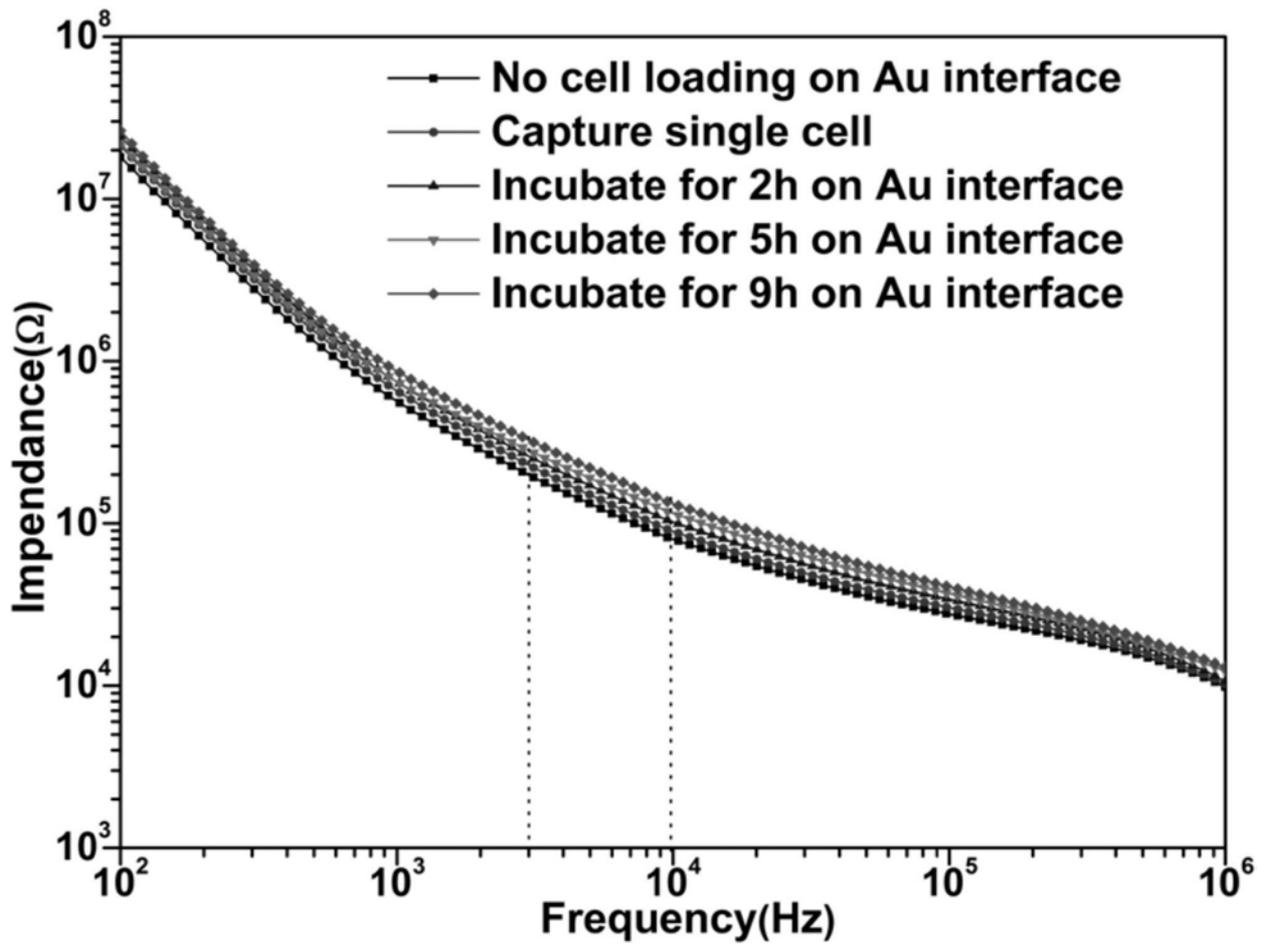


图10a

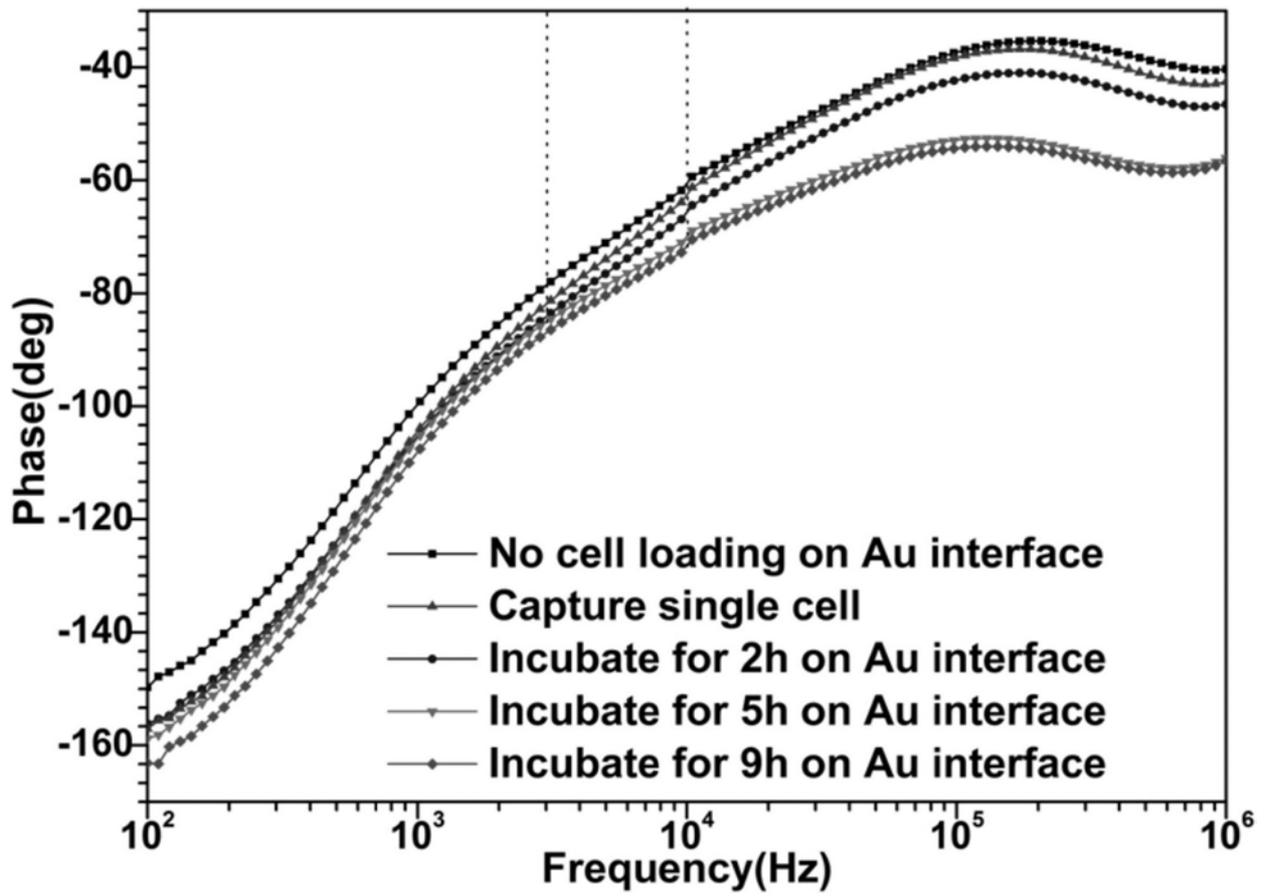


图10b

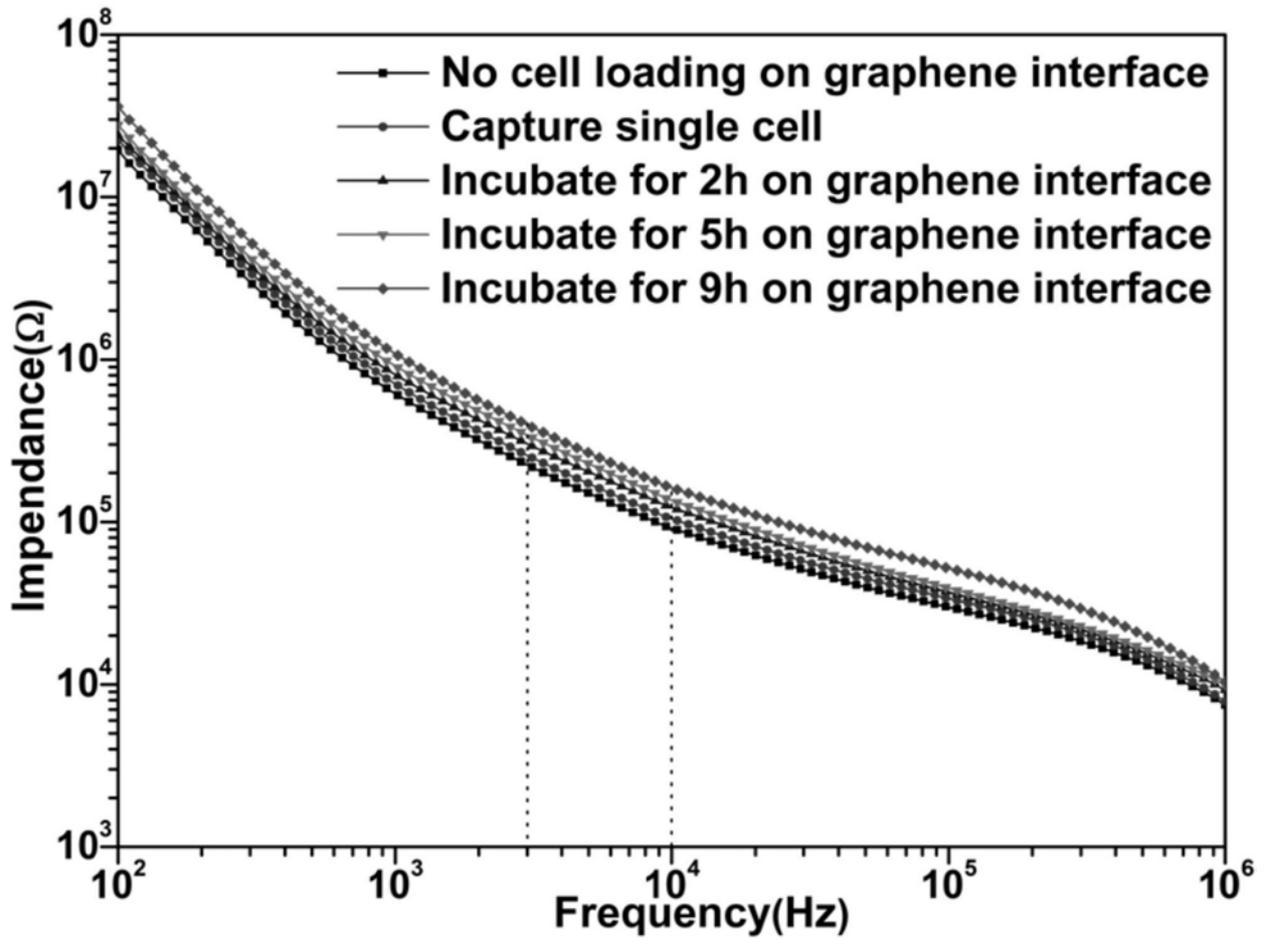


图10c

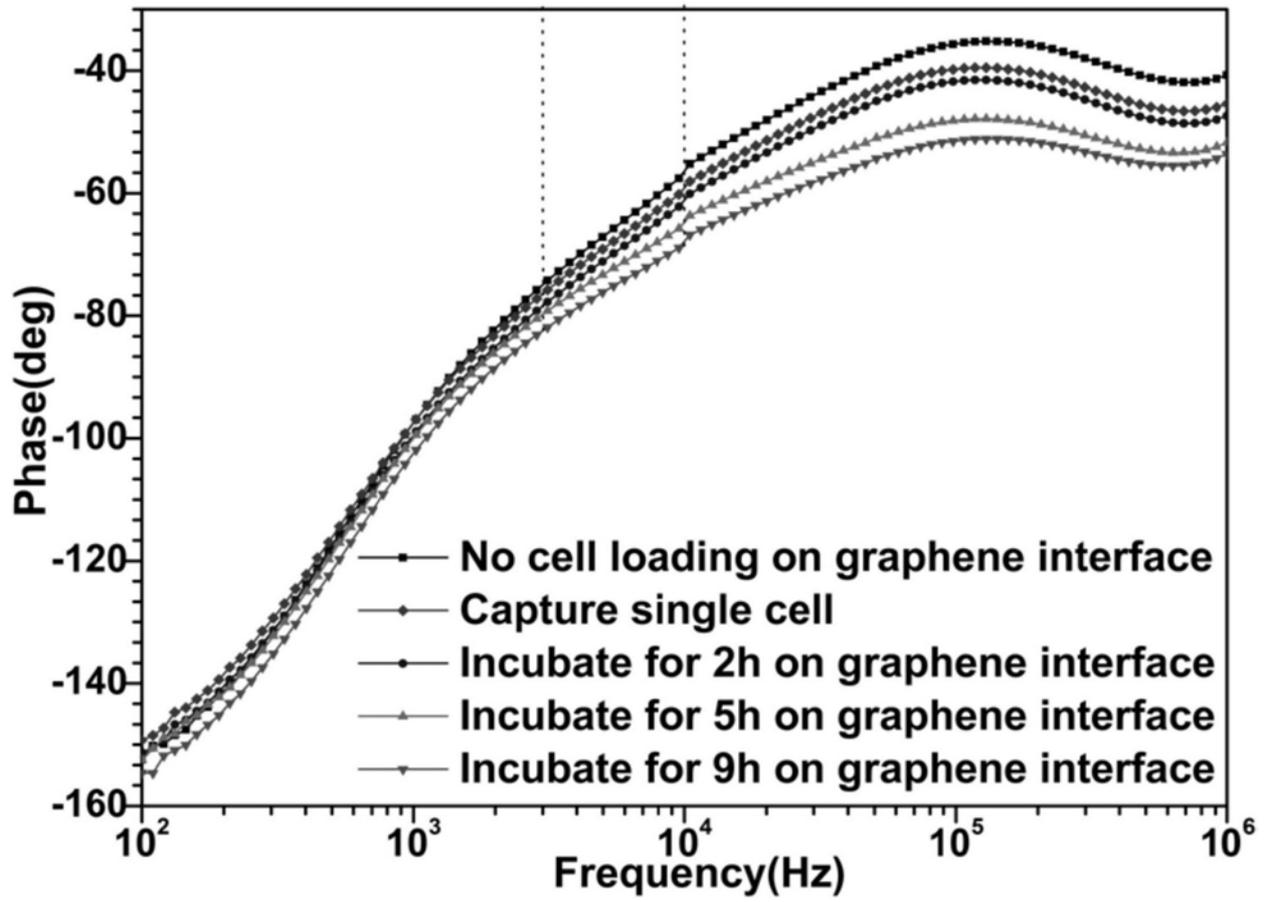


图10d

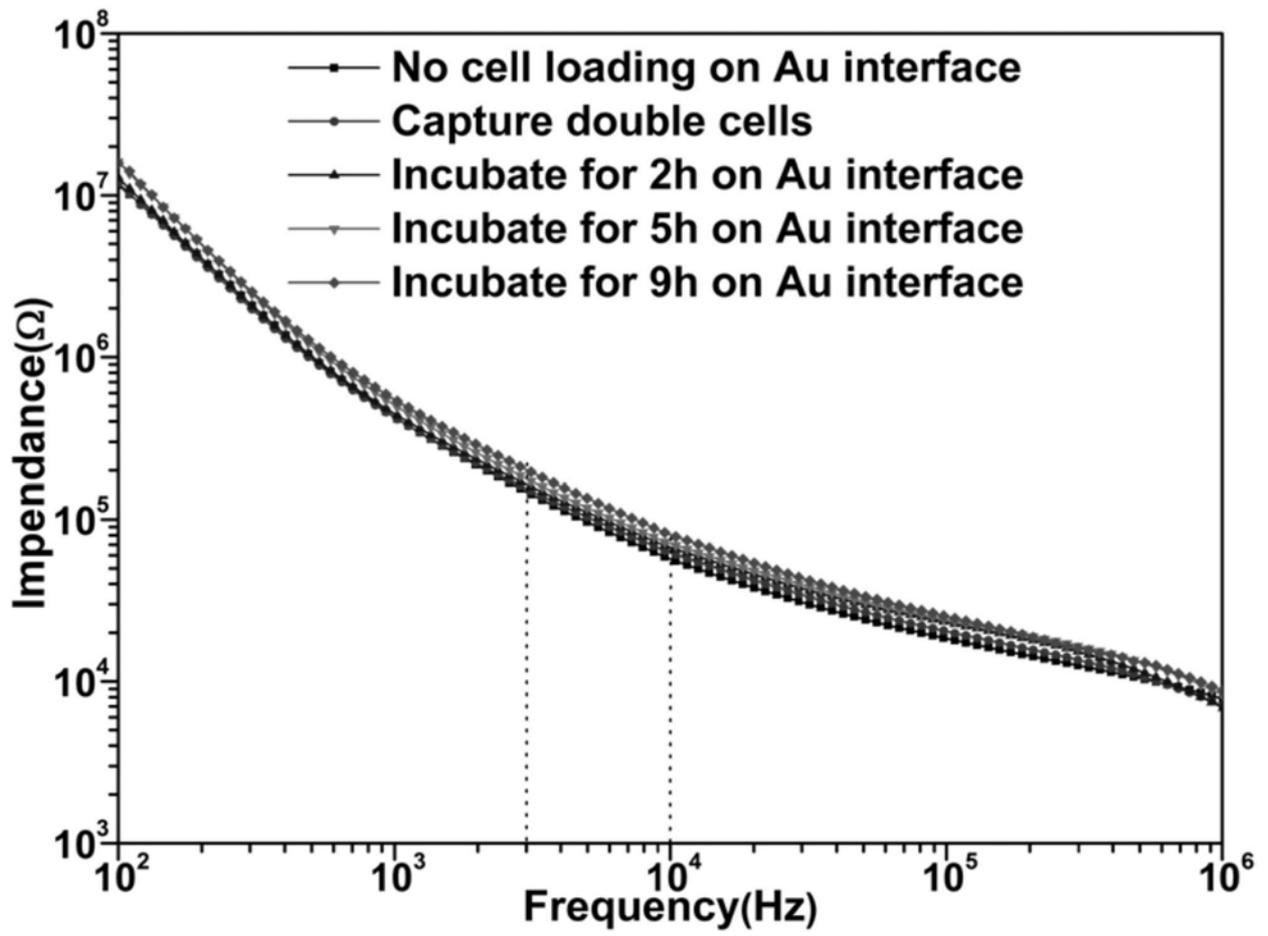


图11a

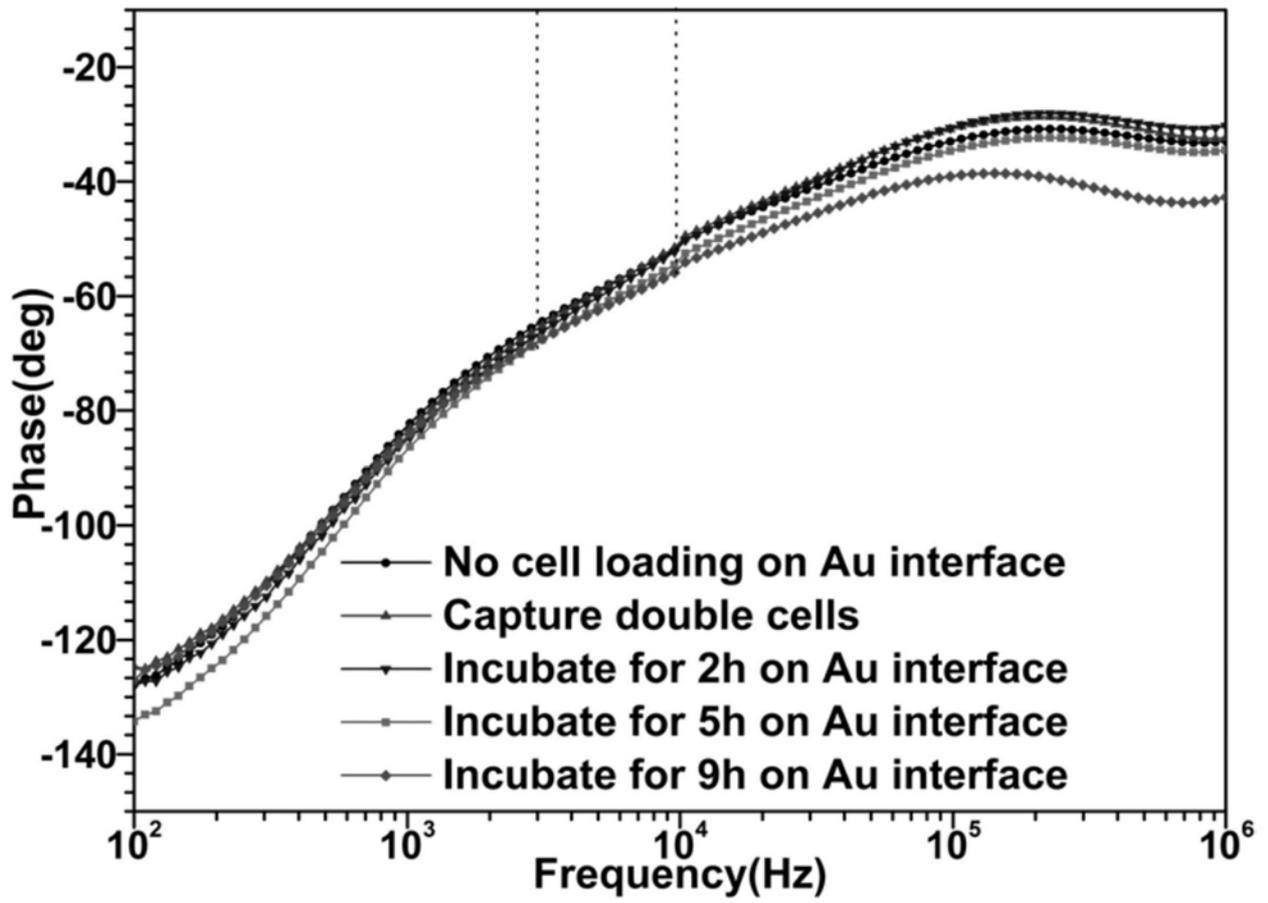


图11b

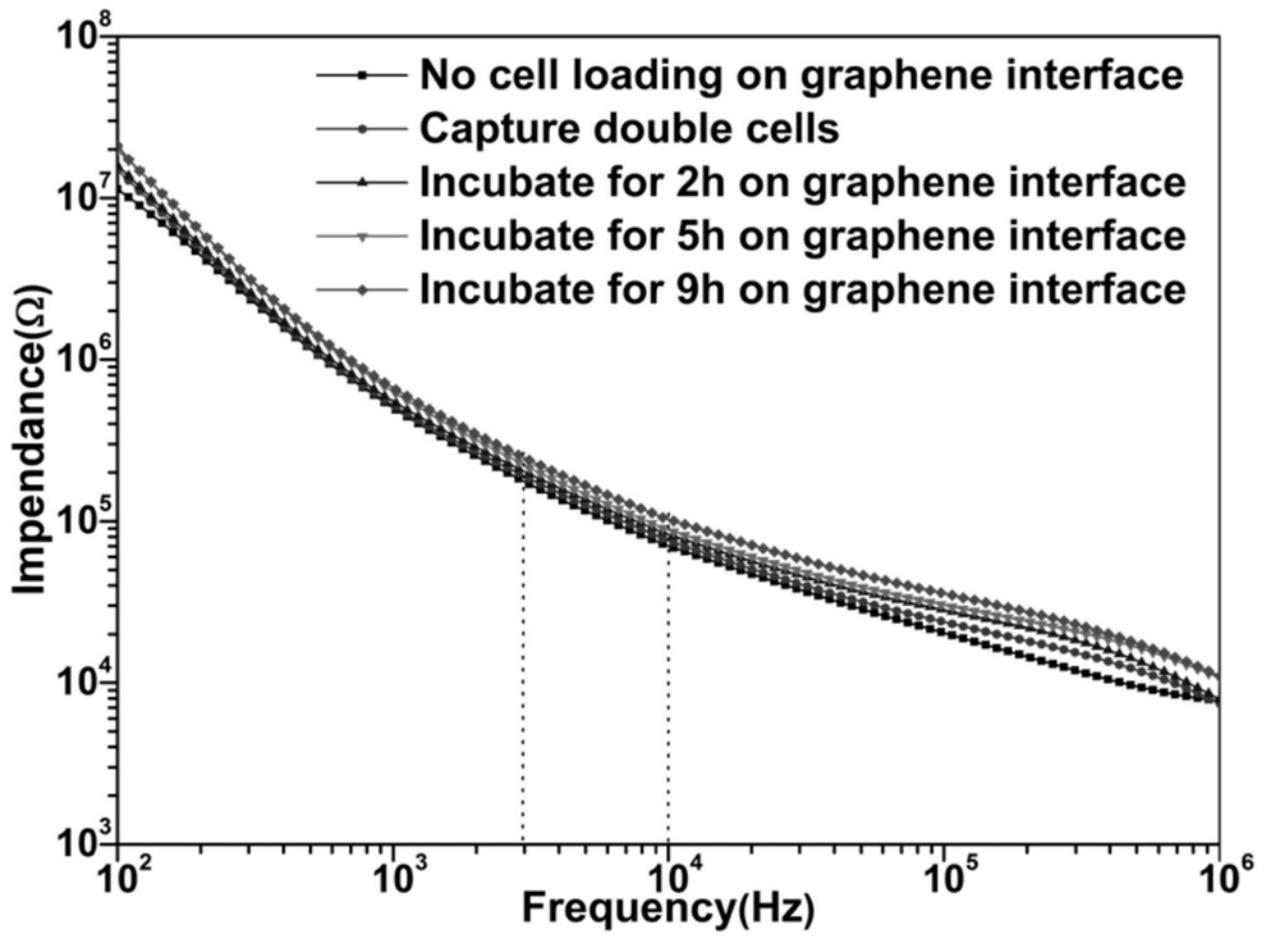


图11c

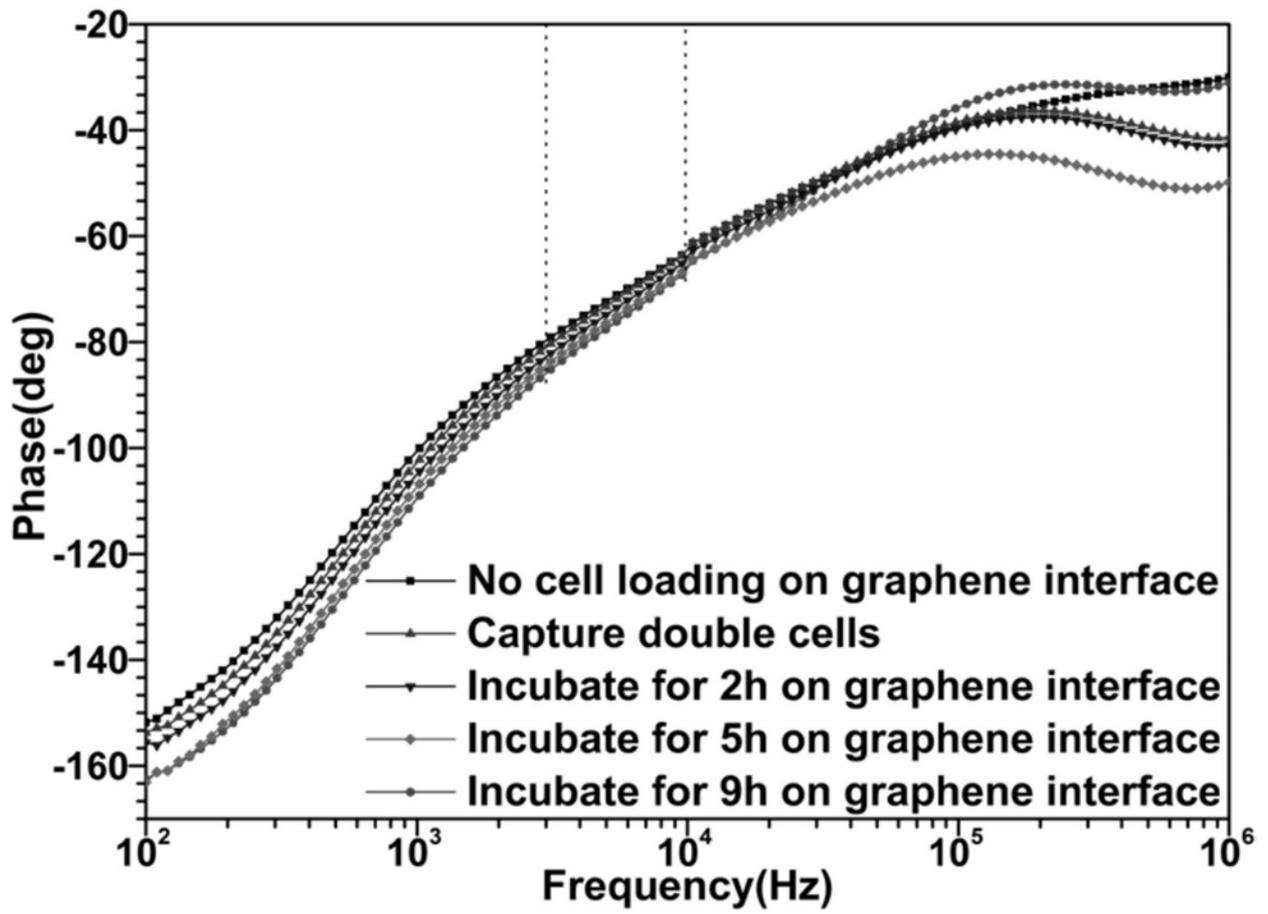


图11d

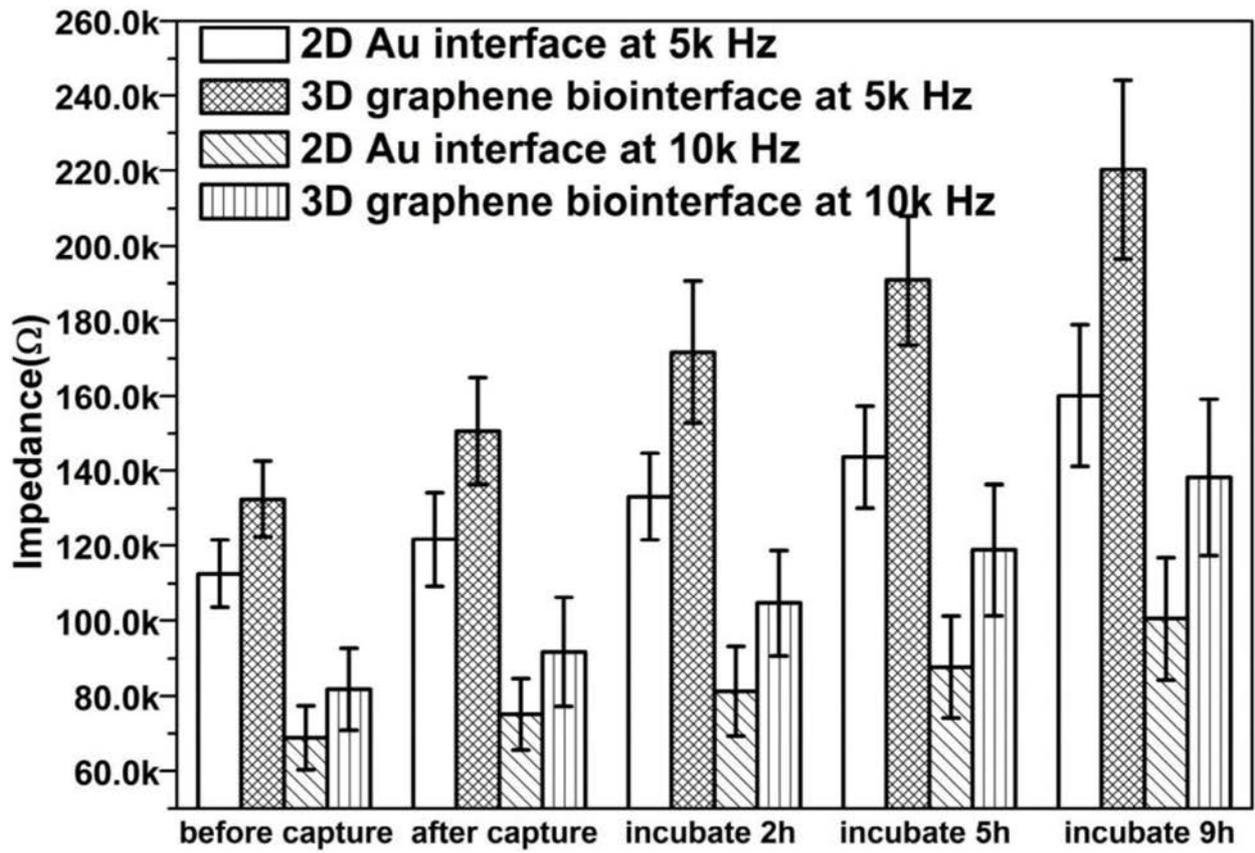


图12

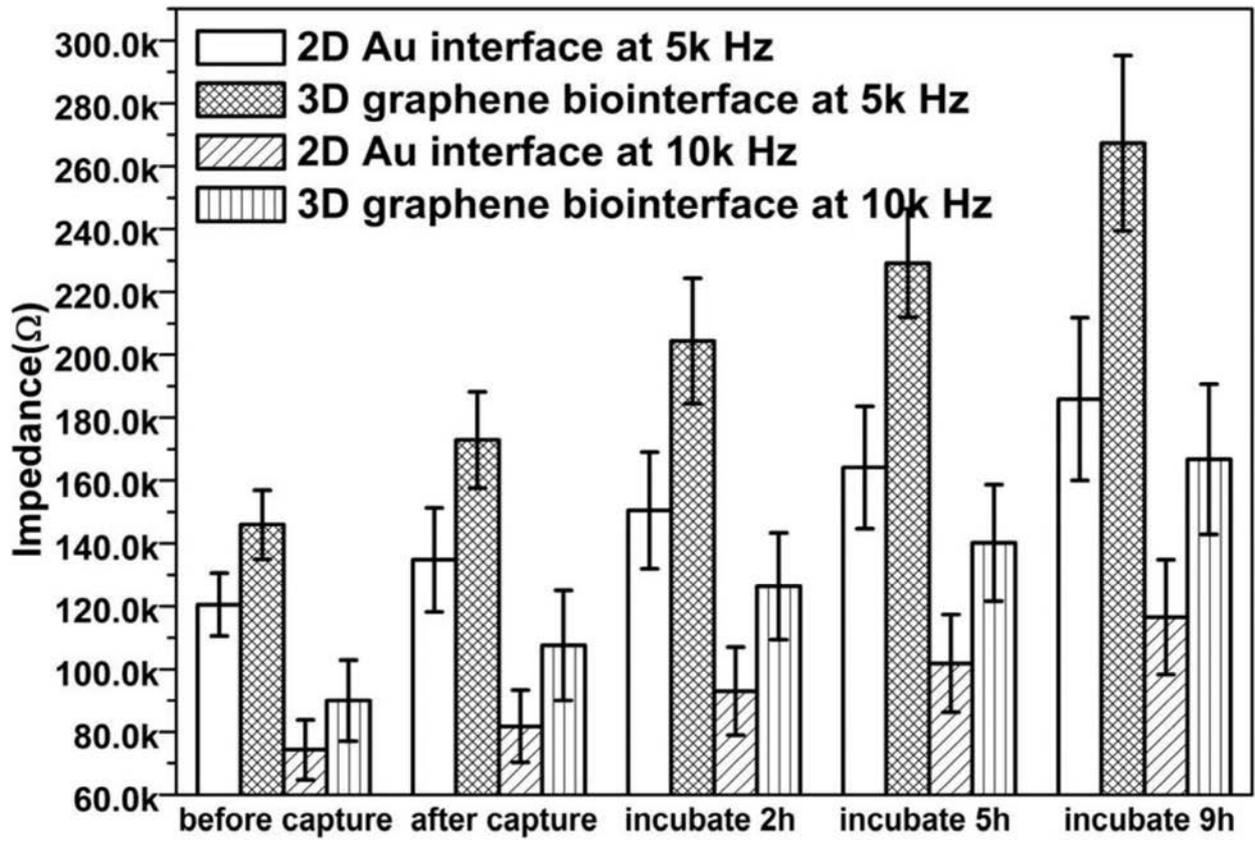


图13

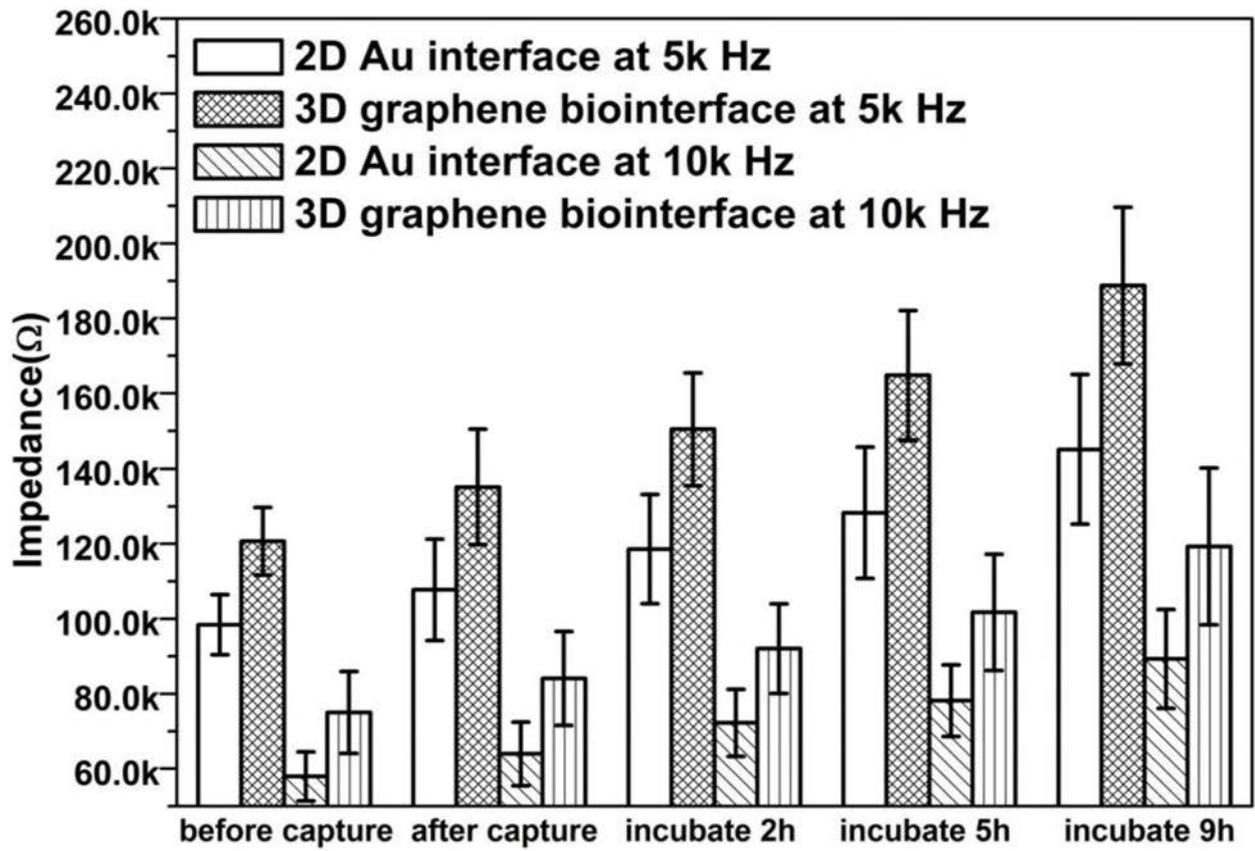


图14