



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108802410 A

(43)申请公布日 2018.11.13

(21)申请号 201810285661.1

(22)申请日 2018.03.22

(71)申请人 广州市第一人民医院(广州消化疾
病中心、广州医科大学附属市一
人民医院、华南理工大学附属第二医
院)

地址 510180 广东省广州市人民北路602号

(72)发明人 刘大渔

(74)专利代理机构 广州市华学知识产权代理有
限公司 44245

代理人 付茵茵 苏运贞

(51)Int. Cl.

G01N 35/00(2006.01)

G01N 35/10(2006.01)

G01N 21/64(2006.01)

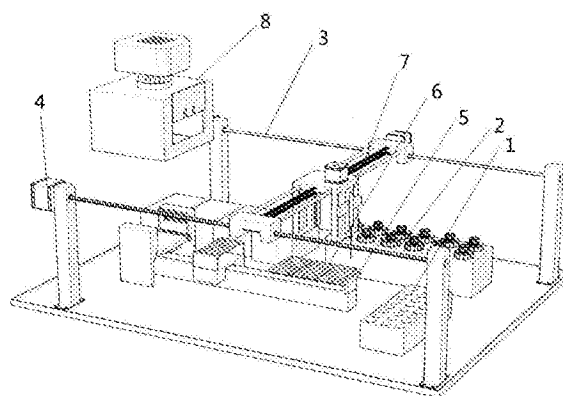
权利要求书2页 说明书6页 附图5页

(54)发明名称

一种液滴芯片细胞分析系统及其分析方法

(57)摘要

本发明公开了一种液滴芯片细胞分析系统,包括:作为基础安装平面的安装平台,承载细胞分析样品的样品承载台,承载细胞分析试剂的试剂承载台,承载开放式芯片的芯片承载台,在样品承载台、试剂承载台、芯片承载台之间平移微量移液的取样针,对芯片进行温度控制的温度控制模块,对芯片中的内容物进行细胞分析的光学检测模块,对光学检测模块进行信号采集的信号采集模块。还包括一种液滴芯片细胞分析系统的分析方法。本发明提供的基于微液滴技术的液滴芯片细胞分析系统集成了一些细胞分析的全过程,具有操作自动化、分析速度快、测试通量高的优势,属于用于生物检测的医疗器械。



1. 一种液滴芯片细胞分析系统,其特征在于:包括:

- 作为基础安装平面的安装平台、
- 承载细胞分析样品的样品承载台、
- 承载细胞分析试剂的试剂承载台、
- 承载开放式芯片的芯片承载台、
- 在样品承载台、试剂承载台、芯片承载台之间平移微量移液的取样针、
- 对芯片进行温度控制的温度控制模块、
- 对芯片中的内容物进行细胞分析的光学检测模块、
- 对光学检测模块进行信号采集的信号采集模块;

样品承载台、试剂承载台、芯片承载台、取样针、温度控制模块、光学检测模块、信号采集模块均集成设置在安装平台上,细胞分析的细胞种植、细胞培养、细胞刺激和细胞反应检测步骤均在该集成的分析系统上进行。

2. 按照权利要求1所述的一种液滴芯片细胞分析系统,其特征在于:还包括空间平移机构、直线平移机构、暗仓;样品承载台、试剂承载台、芯片承载台固定在安装平台上,光学检测模块位于暗仓内,暗仓架设在安装平台上,取样针通过空间平移机构安装在安装平台上;直线平移机构包括承载芯片的滑动平台,滑动平台进入或离开光学检测模块的正下方,温度控制模块安装在滑动平台内。

3. 按照权利要求2所述的一种液滴芯片细胞分析系统,其特征在于:样品承载台、芯片承载台、直线平移机构从前往后依次设置,试剂承载台位于芯片承载台的一侧,直线平移机构驱动滑动平台前后平移,光学检测模块位于直线平移机构的后端的正上方;空间平移机构包括一组前后平移机构、一组左右平移机构和一组上下平移机构,上下平移机构驱动取样针上下平移,左右平移机构驱动取样针左右平移,前后平移机构驱动取样针前后平移。

4. 按照权利要求3所述的一种液滴芯片细胞分析系统,其特征在于:前后平移机构、左右平移机构、上下平移机构均为由电机驱动的丝杠滑块机构。

5. 按照权利要求1所述的一种液滴芯片细胞分析系统,其特征在于:还包括平面平移机构、转动升降臂、暗仓;样品承载台和试剂承载台均为回转式结构,安装在安装平台上;芯片承载台通过平面平移机构安装在安装平台上,进入或离开暗仓;转动升降臂安装在安装平台上,带动取样针升降,以及带动取样针在样品承载台、试剂承载台、芯片承载台之间转动;温度控制模块和光学检测模块设置在暗仓内,当芯片承载台进入暗仓时,光学检测模块位于芯片的正上方或正下方。

6. 按照权利要求5所述的一种液滴芯片细胞分析系统,其特征在于:样品承载台和试剂承载台位于转动升降臂的左前方和右前方,平面平移机构位于转动升降臂的后方,暗仓位于平面平移机构的左端;平面平移机构包括前后平移机构和左右平移机构,驱动芯片承载台在水平面上平移;转动升降臂包括转动臂和带动转动臂升降的上下平移机构。

7. 按照权利要求6所述的一种液滴芯片细胞分析系统,其特征在于:前后平移机构、左右平移机构均为由电机驱动的丝杠滑块机构。

8. 按照权利要求1所述的一种液滴芯片细胞分析系统,其特征在于:光学检测模块包括蓝光LED灯泡、激发光滤光片、发射光滤光片、光电传感器;当芯片位于光学检测模块的正下方时,沿着入射光的方向,蓝光LED灯泡、激发光滤光片、芯片依次设置,沿着出射光的方向,

芯片、发射光滤光片、光电传感器从下往上依次设置。

9. 按照权利要求1至8中任一项所述的一种液滴芯片细胞分析系统的分析方法,其特征在于:样品承载台、试剂承载台、芯片承载台、取样针、温度控制模块、光学检测模块、信号采集模块均集成安装在安装平台上,细胞分析步骤均可在液滴芯片细胞分析系统中完成;取样针抽取样品承载台的细胞分析样品至芯片承载台的芯片上,取样针抽取试剂承载台的细胞分析试剂至芯片承载台的芯片上,或取样针将芯片中的内容物在芯片的不同区域内转移,温度控制模块对芯片中的内容物进行温度控制,光学检测模块对芯片中的内容物进行细胞分析,分析结果由信号采集模块进行采集。

10. 按照权利要求9所述的一种液滴芯片细胞分析系统的分析方法,其特征在于:采用微量移液的方法在芯片上生成一系列包含细胞的液滴,按需要随时向液滴加入或移除试剂及样品,在芯片上即可完成细胞分析全过程,实现单一或多个样品的平行分析。

一种液滴芯片细胞分析系统及其分析方法

技术领域

[0001] 本发明涉及用于生物检测的医疗器械,具体涉及一种液滴芯片细胞分析系统及其分析方法。

背景技术

[0002] 与以试管为载体的传统生物分析相比较,液滴分析具有多方面优势:(1)液滴反应器体积小,可以显著节省试剂消耗;(2)便于实现高通量分析;(3)得益于微体系内反应时间的缩短,可以显著节省分析时间;(4)水相试样被油相包裹,消除了蒸发和表面吸附因素对分析结果的影响。

[0003] 典型的细胞分析步骤包括:细胞种植、细胞培养、细胞刺激和细胞反应检测。现有技术中,不存在能完成所有细胞分析步骤的集成式系统。

发明内容

[0004] 针对现有技术中存在的技术问题,本发明的目的是:提供一种通过全集成方式完成细胞分析的液滴芯片细胞分析系统及其分析方法。

[0005] 为了达到上述目的,本发明采用如下技术方案:

[0006] 一种液滴芯片细胞分析系统,包括:作为基础安装平面的安装平台,承载细胞分析样品的样品承载台,承载细胞分析试剂的试剂承载台,承载开放式芯片的芯片承载台,在样品承载台、试剂承载台、芯片承载台之间平移微量移液的取样针,对芯片进行温度控制的温度控制模块,对芯片中的内容物进行细胞分析的光学检测模块,对光学检测模块进行信号采集的信号采集模块;样品承载台、试剂承载台、芯片承载台、取样针、温度控制模块、光学检测模块、信号采集模块均集成设置在安装平台上,细胞分析的细胞种植、细胞培养、细胞刺激和细胞反应检测步骤均在该集成的分析系统上进行。

[0007] 作为一种优选,一种液滴芯片细胞分析系统,还包括空间平移机构、直线平移机构、暗仓;样品承载台、试剂承载台、芯片承载台固定在安装平台上,光学检测模块位于暗仓内,暗仓架设在安装平台上,取样针通过空间平移机构安装在安装平台上;直线平移机构包括承载芯片的滑动平台,滑动平台进入或离开光学检测模块的正下方,温度控制模块安装在滑动平台内。

[0008] 作为一种优选,样品承载台、芯片承载台、直线平移机构从前往后依次设置,试剂承载台位于芯片承载台的一侧,直线平移机构驱动滑动平台前后平移,光学检测模块位于直线平移机构的后端的正上方;空间平移机构包括一组前后平移机构、一组左右平移机构和一组上下平移机构,上下平移机构驱动取样针上下平移,左右平移机构驱动取样针左右平移,前后平移机构驱动取样针前后平移。

[0009] 作为一种优选,前后平移机构、左右平移机构、上下平移机构均为由电机驱动的丝杠滑块机构。

[0010] 作为一种优选,一种液滴芯片细胞分析系统,还包括平面平移机构、转动升降臂、

暗仓;样品承载台和试剂承载台均为回转式结构,安装在安装平台上;芯片承载台通过平面平移机构安装在安装平台上,进入或离开暗仓;转动升降臂安装在安装平台上,带动取样针升降,以及带动取样针在样品承载台、试剂承载台、芯片承载台之间转动;温度控制模块和光学检测模块设置在暗仓内,当芯片承载台进入暗仓时,光学检测模块位于芯片的正上方或正下方。当光学检测模块采用正置荧光检测系统时,位于正上方,当光学检测模块采用倒置荧光检测系统时,位于正下方。

[0011] 作为一种优选,样品承载台和试剂承载台位于转动升降臂的左前方和右前方,平面平移机构位于转动升降臂的后方,暗仓位于平面平移机构的左端;平面平移机构包括前后平移机构和左右平移机构,驱动芯片承载台在水平面上平移;转动升降臂包括转动臂和带动转动臂升降的上下平移机构。

[0012] 作为一种优选,前后平移机构、左右平移机构均为由电机驱动的丝杠滑块机构。

[0013] 作为一种优选,光学检测模块包括蓝光LED灯泡、激发光滤光片、发射光滤光片、光电传感器;当芯片位于光学检测模块的正下方时,沿着入射光的方向,蓝光LED灯泡、激发光滤光片、芯片依次设置,沿着出射光的方向,芯片、发射光滤光片、光电传感器从下往上依次设置。

[0014] 一种液滴芯片细胞分析系统的分析方法,样品承载台、试剂承载台、芯片承载台、取样针、温度控制模块、光学检测模块、信号采集模块均集成安装在安装平台上,细胞分析步骤均可在液滴芯片细胞分析系统中完成;取样针抽取样品承载台的细胞分析样品至芯片承载台的芯片上,取样针抽取试剂承载台的细胞分析试剂至芯片承载台的芯片上,或取样针将芯片中的内容物在芯片的不同区域内转移,温度控制模块对芯片中的内容物进行温度控制,光学检测模块对芯片中的内容物进行细胞分析,分析结果由信号采集模块进行采集。

[0015] 作为一种优选,采用微量移液的方法在芯片上生成一系列包含细胞的液滴,按需要随时向液滴加入或移除试剂及样品,在芯片上即可完成细胞分析全过程,实现单一或多个样品的平行分析。

[0016] 芯片基片部分包含特定的承载液体微结构或图形化亲水-疏水表面,适合于液滴的发生和定位。芯片材料优选为玻璃、塑料或硅胶,芯片面积优选为10~120平方厘米。

[0017] 本发明的发明机理为,控制取样针在芯片上定位定量加载试剂或样品。借助于取样针进行的不同区域间液体转移,以及外部控制和检测单元,完成一系列细胞分析过程。在包含特定微结构或特定性质表面的芯片上,可以通过微量移液方法形成微液滴。借助于微量移液还可以实现顺序溶液加载或移除,从而完成一系列分析步骤。使用微液滴分析方法,可以降低试剂消耗,减小仪器体积。由于反应体积的减小,液滴内化学反应耗时减少,有助于提高分析速度。此外,整个分析过程中,分散式液滴体系可以避免试样间交叉污染。

[0018] 本发明的特点是:(1)使用微量移液方法在芯片上生成一系列包含细胞的液滴;(2)允许随时向液滴加入或移除试剂及样品;(3)在液滴芯片以全集成方式完成细胞分析过程;(4)应用灵活,满足单一或多个样品平行分析;(5)相比较传统分析方法,显著降低试剂消耗。

[0019] 本发明相对于现有技术具有如下的优点及效果:

[0020] (1)本发明提供的基于微液滴技术的液滴芯片细胞分析系统集成了一些细胞分析的全过程,具有操作自动化、分析速度快、测试通量高的优势。

- [0021] (2) 该系统应用灵活,满足单一或多个样品平行分析。
- [0022] (3) 本发明提供的基于微液滴技术的细胞分析方法显著降低试剂消耗,有助于节省测试成本。
- [0023] (4) 系统采用微量移液方式实现简便直接的液体操控。
- [0024] (5) 使用集成式的安装平台结构,有利于减小仪器体积。
- [0025] 综上所述,本发明提供的基于微液滴技术的液滴芯片细胞分析系统具有体积小、试剂消耗量低和分析速度快的优点,适合于单个样本和批量样品的分析。该系统显著降低了该类设备的购买和运行成本,并提高工作效率。

附图说明

- [0026] 图1是实施例一的一种液滴芯片细胞分析系统的立体图。
- [0027] 图2是实施例二的一种液滴芯片细胞分析系统的立体图。
- [0028] 图3是图1和图2中光学检测模块的结构示意图。
- [0029] 图4是采用实施例一分析系统实现的在具有图形化亲水点玻璃芯片上进行基于显色反应的细菌抗生素敏感性测试操作流程图中。
- [0030] 图5是采用实施例二分析系统实现的在具有微坑阵列塑料芯片上进行纳米磁粒辅助的细菌抗生素敏感性分析操作流程图中。
- [0031] 图6是采用实施例一分析系统实现的在一种具有微坑阵列硅胶芯片上进行抗肺癌药物测试的操作流程图中。
- [0032] 其中,1为样品承载台,2为试剂承载台,3为丝杠,4为电机,5为芯片承载台,6为芯片,7为取样针,8为暗仓,9为温度控制模块,10为蓝光LED灯泡,11为激发光滤光片,12为发射光滤光片,13为光电传感器,14为转动升降臂。

具体实施方式

- [0033] 下面来对本发明做进一步详细的说明。
- [0034] 实施例一
- [0035] 一种液滴芯片细胞分析系统,包括:作为基础安装平面的安装平台,承载细胞分析样品的样品承载台,承载细胞分析试剂的试剂承载台,承载开放式芯片的芯片承载台,在样品承载台、试剂承载台、芯片承载台之间平移微量移液的取样针,对芯片进行温度控制的温度控制模块,对芯片中的内容物进行细胞分析的光学检测模块,对光学检测模块进行信号采集的信号采集模块,空间平移机构,直线平移机构,安装光学检测模块的暗仓;样品承载台、试剂承载台、芯片承载台、取样针、温度控制模块、光学检测模块、信号采集模块均集成设置在安装平台上,细胞分析的细胞种植、细胞培养、细胞刺激和细胞反应检测步骤均在该集成的分析系统上进行。
- [0036] 本实施例通过空间平移机构实现取样针相对于样品承载台、试剂承载台、芯片承载台的空间位置平移。通过直线平移机构实现芯片进入或离开暗仓。具体结构如下:
- [0037] 样品承载台、试剂承载台、芯片承载台固定在安装平台上,光学检测模块位于暗仓内,暗仓架设在安装平台上,取样针通过空间平移机构安装在安装平台上;直线平移机构包括承载芯片的滑动平台,滑动平台进入或离开光学检测模块的正下方,温度控制模块安装

在滑动平台内。样品承载台、芯片承载台、直线平移机构从前往后依次设置,试剂承载台位于芯片承载台的一侧,直线平移机构驱动滑动平台前后平移,光学检测模块位于直线平移机构的后端的正上方;空间平移机构包括一组前后平移机构、一组左右平移机构和一组上下平移机构,上下平移机构驱动取样针上下平移,左右平移机构驱动取样针左右平移,前后平移机构驱动取样针前后平移。前后平移机构、左右平移机构、上下平移机构均为由电机驱动的丝杠滑块机构。光学检测模块包括蓝光LED灯泡、激发光滤光片、发射光滤光片、光电传感器;当芯片位于光学检测模块的正下方时,沿着入射光的方向,蓝光LED灯泡、激发光滤光片、芯片依次设置,沿着出射光的方向,芯片、发射光滤光片、光电传感器从下往上依次设置。

[0038] 操作方式为:通过前后平移机构和左右平移机构控制取样针的平面位置,通过上下平移机构控制取样针的升降;取样针完成样品在样品承载台至芯片承载台的芯片转移,完成试剂在试剂承载台至芯片承载台的芯片转移,完成内容物在承载台的芯片至滑动平移机构的芯片转移;直线平移机构完成滑动平台进出暗仓;温度控制模块装于滑动平台上。

[0039] 实施例二

[0040] 一种液滴芯片细胞分析系统,包括:作为基础安装平面的安装平台,承载细胞分析样品的样品承载台,承载细胞分析试剂的试剂承载台,承载开放式芯片的芯片承载台,在样品承载台、试剂承载台、芯片承载台之间平移微量移液的取样针,对芯片进行温度控制的温度控制模块,对芯片中的内容物进行细胞分析的光学检测模块,对光学检测模块进行信号采集的信号采集模块,平面平移机构,转动升降臂,安装光学检测模块的暗仓;样品承载台、试剂承载台、芯片承载台、取样针、温度控制模块、光学检测模块、信号采集模块均集成设置在安装平台上,细胞分析的细胞种植、细胞培养、细胞刺激和细胞反应检测步骤均在该集成的分析系统上进行。

[0041] 本实施例通过转动升降臂实现取样针相对于样品承载台、试剂承载台、芯片承载台的空间位置变化。通过平面平移机构实现芯片承载台与取样针位置适配,实现芯片进出暗仓。具体结构如下:

[0042] 样品承载台和试剂承载台均为回转式结构,安装在安装平台上;芯片承载台通过平面平移机构安装在安装平台上,进入或离开暗仓;转动升降臂安装在安装平台上,带动取样针升降,以及带动取样针在样品承载台、试剂承载台、芯片承载台之间转动;温度控制模块和光学检测模块设置在暗仓内,当芯片承载台进入暗仓时,光学检测模块位于芯片的正上方。样品承载台和试剂承载台位于转动升降臂的左前方和右前方,平面平移机构位于转动升降臂的后方,暗仓位于平面平移机构的左端;平面平移机构包括前后平移机构和左右平移机构,驱动芯片承载台在水平面上平移;转动升降臂包括转动臂和带动转动臂升降的上下平移机构。前后平移机构、左右平移机构均为由电机驱动的丝杠滑块机构。光学检测模块包括蓝光LED灯泡、激发光滤光片、发射光滤光片、光电传感器;当芯片位于光学检测模块的正下方时,沿着入射光的方向,蓝光LED灯泡、激发光滤光片、芯片依次设置,沿着出射光的方向,芯片、发射光滤光片、光电传感器从下往上依次设置。

[0043] 操作方式为:通过转动升降臂实现取样针的平面位置移动以及升降,配合平面平移机构,实现取样针与芯片承载台上芯片的准确对位,同时平面平移机构使得芯片进出暗仓。温度控制模块安装于暗仓内,光学检测模块安装于暗仓内且位于温度控制模块的正上

方。

[0044] 实施例三

[0045] 采用实施例一分析系统实现在具有图形化亲水点玻璃芯片上进行基于显色反应的细菌抗生素敏感性测试。

[0046] 实验使用玻璃材质芯片,尺寸为5×10cm。芯片具有一组6×12亲水点阵,每个亲水点的直径为3mm,亲水点周围的区域做疏水疏油涂层处理。

[0047] 具体步骤如下:

[0048] (1) 取样针顺序吸取5μL FC-40氟化油和5μL尿液,加载于列亲水点,共计形成6行12列共计72个液滴。

[0049] (2) 向每行液滴加入含有一种抗生素的六个浓度(0-5)的培养基5μL。测试种抗生素有12种,包括:红霉素、克林霉素、氨苄青霉素、万古霉素、庆大霉素、环丙沙星、左氧氟沙星、亚胺培南、头孢唑啉、头孢曲松、四环素。

[0050] (3) 37度培养4小时。

[0051] (4) 向每个液滴加入1μL syto9染液。

[0052] (5) 驱动芯片定向移动进入暗仓,检测液滴内荧光强度。

[0053] (6) 对照每列中未加抗生素液滴,计算其它液滴中荧光强度下降情况,如下降超过85%,判定为敏感;下降介于50-85%,判定为中度敏感;下降介于15-50%,判定为低度敏感;下降介于15%,判定为耐药。

[0054] 实施例四

[0055] 采用实施例二分析系统实现在具有微坑阵列塑料芯片上进行纳米磁粒辅助的细菌抗生素敏感性分析。

[0056] 实验使用聚四氟乙烯材质液滴芯片,尺寸为10×12cm。芯片包含48组80×80微坑阵列,每个微坑的直径为75微米。

[0057] 具体步骤如下:

[0058] (1) 使用48孔板,每孔加入尿液样品25微升。测试种抗生素有8种,包括:克林霉素、氨苄青霉素、万古霉素、庆大霉素、左氧氟沙星、亚胺培南、头孢唑啉、头孢曲松。每种抗生素选用6个浓度。将含有抗生素的培养基25微升加入培养孔,与尿液样品混合。孔板37度培养30min。

[0059] (2) 聚四氟乙烯材质液滴芯片表面覆盖矿物油。

[0060] (3) 取样针顺序吸取10微升Syto9荧光染料溶液(0.5μmol/L),重复操作,加于每个微坑。

[0061] (4) 取样针从48孔板一个孔吸取5微升样品,加载于一个80×80微坑阵列,每个微坑加入100pL。

[0062] (5) 清洗取样针后从48孔板另一个孔吸取5微升样品,加载于一个80×80微坑阵列,每个微坑加入100pL,重复操作直至加满48个微坑阵列。

[0063] (6) 将芯片安放在倒置荧光显微镜上,扫描液滴阵列。有荧光的液滴判定为细菌(+),无荧光的液滴判定为细菌(-),计算每个液滴阵列中细菌(+)液滴比例(p)。

[0064] (7) 与未施加抗菌药物的原始样品p值比较,计算各组施加抗生素细菌的30min内增殖率变化,以此判定细菌对于抗生素的敏感性。

[0065] 实施例五

[0066] 采用实施例一分析系统实现在一种具有微坑阵列硅胶芯片上进行抗肺癌药物测试。

[0067] 实验使用硅胶材质芯片,尺寸为 5×10 cm。芯片具有一组 8×12 微孔点阵,每个微孔的直径为3mm,亲水点周围的区域做疏水疏油涂层处理。

[0068] 具体步骤如下:

[0069] (1) 取样针顺序吸取 $5\mu\text{L}$ FC40氟化油和 $5\mu\text{L}$ 含有乳腺癌细胞(密度为 $10^5/\text{mL}$)的2%海藻酸钠-PBS溶液,加载于微孔中。重复操作96次,加入每个微孔。

[0070] (2) 取样针吸取 $5\mu\text{L}$ $25\mu\text{mol/L}$ CaCl_2 溶液,加载于微孔中。重复操作96次,加入每个微孔。

[0071] (3) 取样针吸取 $5\mu\text{L}$ DMEM培养液,加载于微孔中。重复操作96次,加入每个微孔。

[0072] (4) 37度下培养48小时。

[0073] (5) 吸除每个微孔中的培养基,加入含有抗肿瘤药物的DMEM培养基。每种药物包含8个浓度,一共有12种,分配在 12×8 微孔阵列中。测试药物包括:顺铂、卡铂、阿霉素、氟尿嘧啶、丝裂霉素、甲氨蝶呤、长春新碱、紫杉醇、多柔比星、厄洛替尼、吉非替尼、伊马替尼,培养24小时。

[0074] (6) 吸除每个微孔中的培养基,加入钙黄绿素-AM (Calcein-AM) 和碘化丙啶 (PI) 溶液,终浓度分别为 $2\mu\text{mol/L}$ 和 $4\mu\text{mol/L}$,37度孵育10分钟。

[0075] (7) 吸除每个微孔中的溶液,每个微孔重新加入 $10\mu\text{L}$ PBS溶液。

[0076] (8) 倒置荧光显微镜下呈像检测每个微孔中的细胞存活率。

[0077] 上述实施例为本发明较佳的实施方式,但本发明的实施方式并不受上述实施例的限制,其他的任何未背离本发明的精神实质与原理下所作的改变、修饰、替代、组合、简化,均应为等效的置换方式,都包含在本发明的保护范围之内。

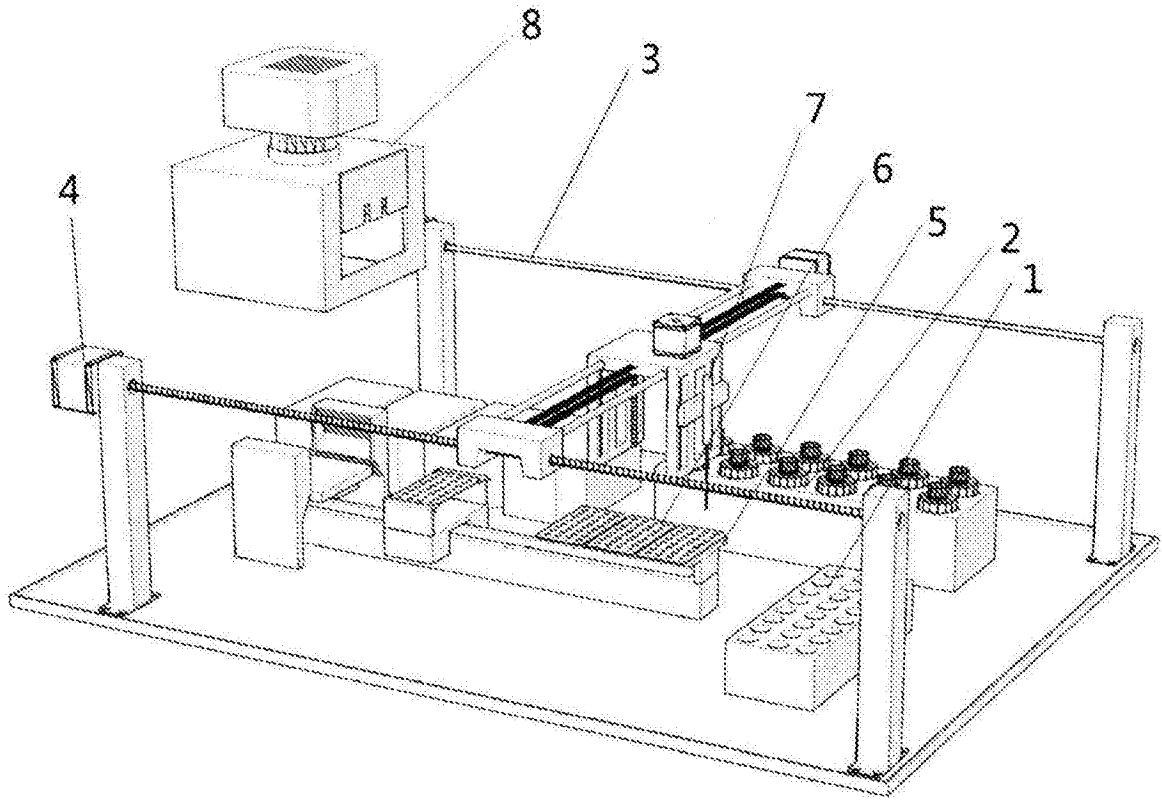


图1

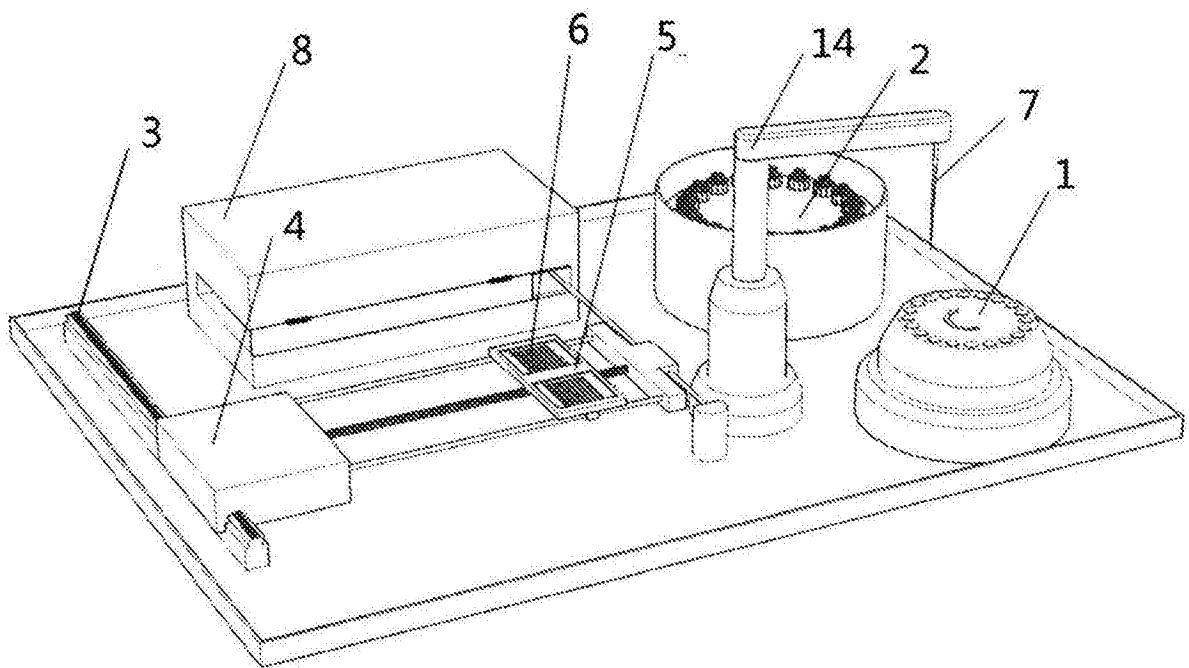


图2

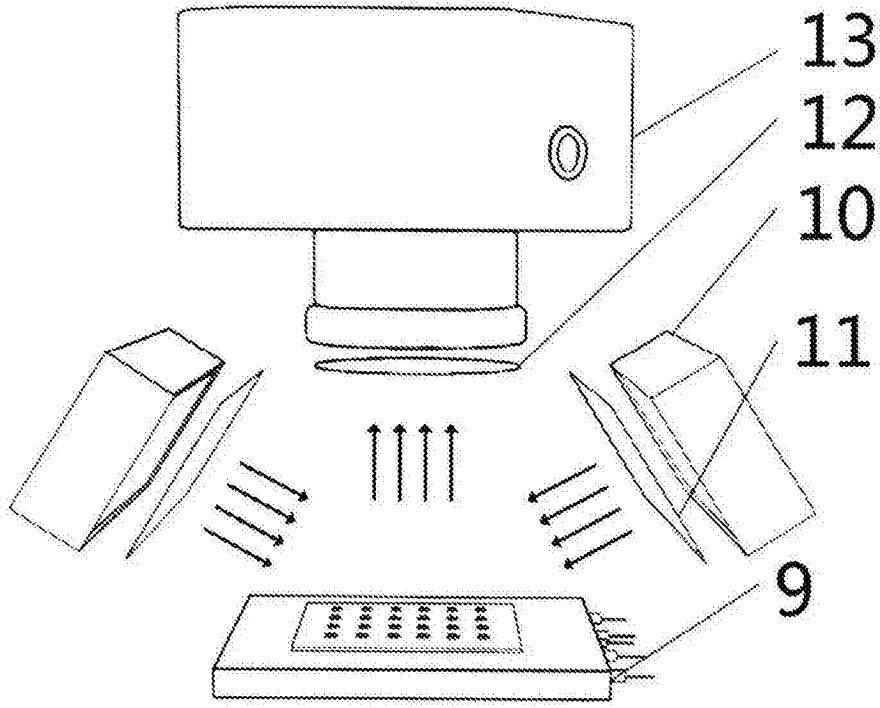


图3

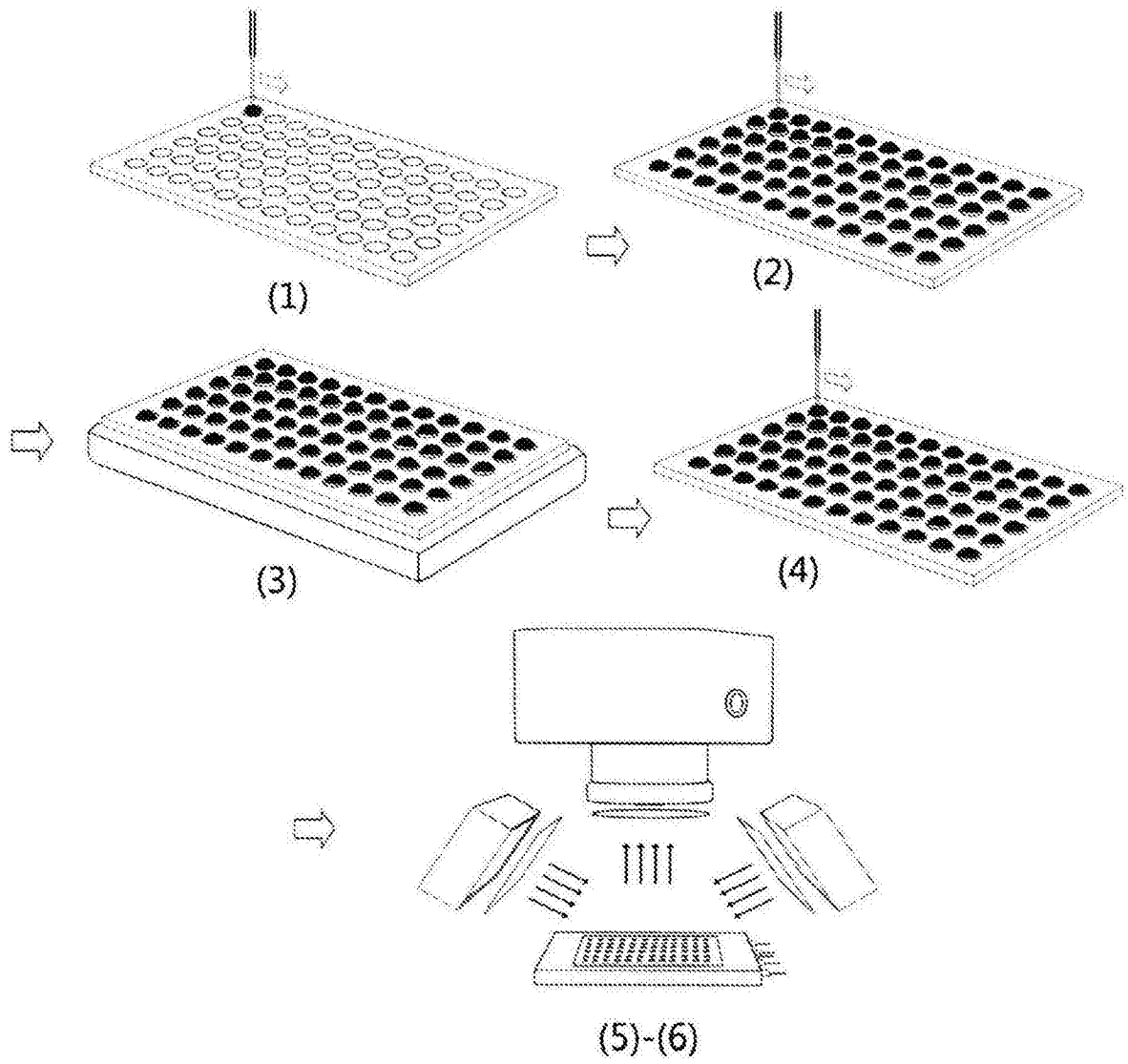


图4

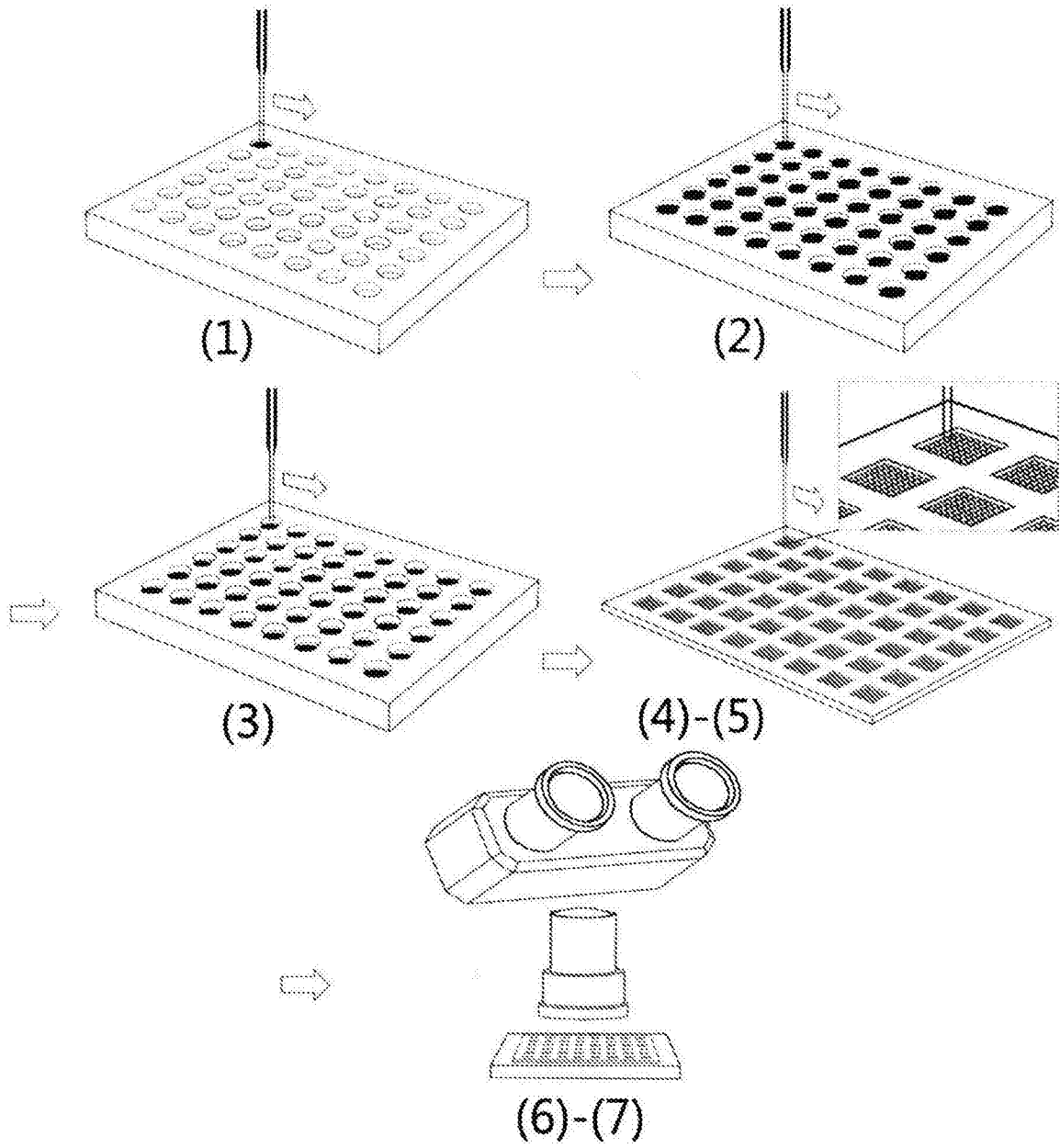


图5

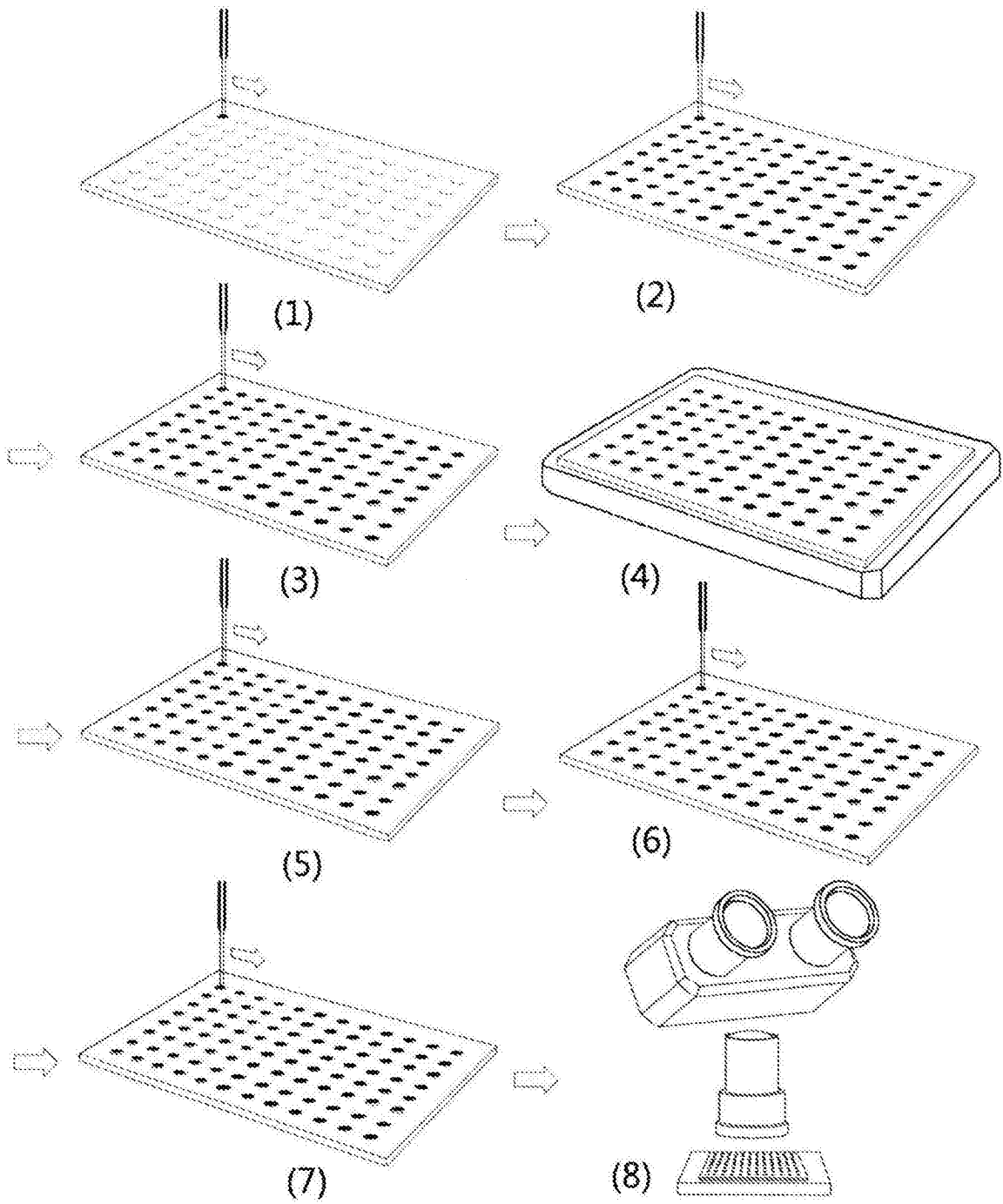


图6