



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104871026 B

(45)授权公告日 2020.01.10

(21)申请号 201380065739.4
 (22)申请日 2013.12.13
 (65)同一申请的已公布的文献号
 申请公布号 CN 104871026 A
 (43)申请公布日 2015.08.26
 (30)优先权数据
 1301992.2 2013.02.05 GB (续)
 (85)PCT国际申请进入国家阶段日
 2015.06.16
 (86)PCT国际申请的申请数据
 PCT/EP2013/076569 2013.12.13
 (87)PCT国际申请的公布数据
 W02014/095645 EN 2014.06.26
 (73)专利权人 通用电气公司
 地址 美国纽约州
 (72)发明人 R.文卡特桑 A.巴拉苏拉马尼安
 C.R.阿特雷亚 R.赫格德 (续)
 (74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
 72001
 代理人 初明明 吕彩霞
 (51)Int.Cl.
 G01R 33/465(2006.01) (续)

(56)对比文件
 CN 105920620 A,2016.09.07,
 CN 101641352 A,2010.02.03,
 WO 2011/120712 A1,2011.10.06,
 CN 104614513 A,2015.05.13,
 WO 2010/109346 A1,2010.09.30,
 WO 2009/045551 A1,2009.04.09,
 US 2007/0111330 A1,2007.05.17,
 Huilin Shao et.al.Magnetic
 nanoparticles for biomedical NMR-based
 diagnostics.《BEILSTEIN JOURNAL OF
 NANOTECHNOLOGY》.2010,第1卷(第1期),第142-
 154页.
 Hakho Lee et.al.Ultrasensitive
 Detection of Bacteria Using Core-Shell
 Nanoparticles and an NMR-Filter System.
 《ANGEWANDTE CHEMIE》.2009,第121卷(第31期),
 第5767-5770页. (续)

审查员 刘颖

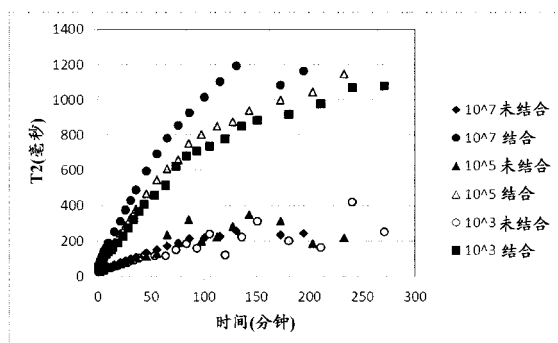
权利要求书2页 说明书17页 附图9页

(54)发明名称
 靶物质的体外磁共振检测

(57)摘要

本发明提供通过磁共振检测在生物样本中靶物质的存在的体外方法,该方法包括:(a)提供包括生物样本和多个磁纳米颗粒的混合物,其中所述磁纳米颗粒包含当靶物质存在于生物样本中时能够结合靶物质的结合剂;和(b)确定与样本中的靶物质结合的磁纳米颗粒对应的T₂弛豫时间(T_{2结合});其中T_{2结合}不同于未与靶物质结合的磁纳米颗粒对应的T₂弛豫时间(T_{2自由}),和其中T_{2结合}在没有将与靶物质结合的磁纳米颗粒和未与靶物质结合的磁纳米颗粒物理上分离的情况

下确定。



CN 104871026 B

[接上页]

(30) 优先权数据

3886/DEL/2012 2012.12.17 IN

(72) 发明人 R.U.穆克赫杰

(51) Int.Cl.

G01N 33/543(2006.01)

(56) 对比文件

Hakho Lee et.al.Ultrasensitive
Detection of Bacteria Using Core-Shell
Nanoparticles and an NMR-Filter System.
《ANGEWANDTE CHEMIE》.2009,第121卷(第31期),
第5767-5770页.

1. 一种通过磁共振检测在生物样本中的靶物质的存在的体外方法,所述方法包括:

(a) 提供包含生物样本和多个磁纳米颗粒的混合物,其中所述磁纳米颗粒包含当所述靶物质存在于生物样本中时能够结合靶物质的结合剂;和

(b) 确定 $T_{2\text{结合}}$ 和 $T_{2\text{自由}}$ 两个分开的 T_2 值,其中 $T_{2\text{结合}}$ 是与样本中的所述靶物质结合的磁纳米颗粒对应的 T_2 弛豫时间;和

$T_{2\text{自由}}$ 是与未与靶物质结合的磁纳米颗粒对应的 T_2 弛豫时间,并且其中 $T_{2\text{结合}}$ 和 $T_{2\text{自由}}$ 二者在没有将与靶物质结合的磁纳米颗粒和未与靶物质结合的磁纳米颗粒物理上分离的情况下确定,

其中通过NMR数据的信号处理将 $T_{2\text{结合}}$ 与 $T_{2\text{自由}}$ 区分以获得 $T_{2\text{结合}}$ 和 $T_{2\text{自由}}$ 的分开的值,其中所述信号处理包括将双指数拟合应用到从混合物获得的NMR数据以获得 $T_{2\text{结合}}$ 和 $T_{2\text{自由}}$ 的分开的值,

其中所述方法用于非诊断目的。

2. 如权利要求1所述的通过磁共振检测在生物样本中的靶物质的存在的体外方法,所述方法包括:

(a) 提供包含生物样本的测试样本;

(b) 提供多个磁纳米颗粒,其中所述磁纳米颗粒包含能够结合靶物质的结合剂;

(c) 将所述测试样本与多个磁纳米颗粒接触以提供含有磁纳米颗粒和测试样本的混合物;

(d) 确定 $T_{2\text{结合}}$ 和 $T_{2\text{自由}}$ 两个分开的 T_2 值,其中 $T_{2\text{结合}}$ 是与样本中的靶物质结合的磁纳米颗粒对应的 T_2 弛豫时间;和

$T_{2\text{自由}}$ 是与未与靶物质结合的磁纳米颗粒对应的 T_2 弛豫时间,并且其中 $T_{2\text{结合}}$ 和 $T_{2\text{自由}}$ 二者在没有将与靶物质结合的磁纳米颗粒和未与靶物质结合的磁纳米颗粒物理上分离的情况下确定。

3. 如权利要求1或权利要求2所述的方法,其中所述靶物质是细胞。

4. 如权利要求1或权利要求2所述的方法,其中所述靶物质是病原体。

5. 如权利要求1或权利要求2所述的方法,其中所述靶物质是细菌细胞。

6. 如权利要求1或权利要求2所述的方法,其中所述双指数拟合使用以下等式(1)来应用

$$y = A1 * \exp -(x/\tau1) + A2 * \exp -(x/\tau2) + 0 \quad (\text{等式1})$$

其中:

$A1, A2$ = 在时间零点时分量1和2的振幅

$\tau1, \tau2$ = 分量1和2的 T_2 衰减常数

0 = 偏移量。

7. 如权利要求1或权利要求2所述的方法,其中使所述混合物经历多回波自旋-回波脉冲序列。

8. 如权利要求1或权利要求2所述的方法,其进一步包括定量在混合物中的靶物质的量。

9. 如权利要求8所述的方法,其中所述 $T_{2\text{结合}}$ 的值取决于在混合物中靶物质的量,和在混合物中靶物质的量通过将 $T_{2\text{结合}}$ 的值与在靶物质的不同浓度下测量的 $T_{2\text{结合}}$ 值的标准曲线比较

而确定。

10. 如权利要求8所述的方法,其中所述 $T_{2\text{结合}}$ 的值取决于在混合物中靶物质的量,和将 $T_{2\text{结合}}$ 的值与从包含已知量的靶物质的参考样本获得的一个或多个标准值比较。

11. 如权利要求1或权利要求2所述的方法,其中所述方法在微-MR装置上实施。

12. 如权利要求1或权利要求2所述的方法,其中所述磁纳米颗粒包含与结合剂缀合的超顺磁颗粒。

13. 如权利要求1或权利要求2所述的方法,其中所述磁纳米颗粒包括含有超顺磁氧化铁的核和与颗粒缀合的结合剂。

14. 如权利要求1或权利要求2所述的方法,其中所述结合剂是包含对靶物质有特异性的结合位点的抗体或抗体片段。

15. 如权利要求1或权利要求2所述的方法,其中所述生物样本从个体获得。

靶物质的体外磁共振检测

技术领域

[0001] 本文中公开的主题物质涉及使用磁共振检测在生物样本中的靶物质例如细胞或病原体的体外方法。

[0002] 发明背景

[0003] 检测在生物样本中的临床相关物质,例如细胞和病原体,在诊断领域中是重要的。许多传统检测策略基于光学技术。然而,所述技术常常受有害作用例如光散射、吸收和自发荧光影响。将所述作用最小化可需要在记录测量之前的大量的样品纯化。

[0004] 运用磁纳米颗粒的检测策略提供超过传统检测方法的独特的优势。例如,生物样本显示可忽略不计的磁性背景,并因此磁纳米颗粒的使用提供了在不让样本经历大量预处理步骤的情况下在样本中获得非常灵敏的测量的机会。

[0005] 磁纳米颗粒可包括无机的磁性核和在生理条件下稳定该颗粒的生物相容性表面涂层。通过应用合适的表面化学,功能性配体可被掺合在所述纳米颗粒上以赋予分子特异性。

[0006] 当将磁纳米颗粒放置在外场中,每个颗粒产生局部磁场,其增加了场的不均一性。当水分子散布在所述纳米颗粒的附近时,这具有扰乱水质子自旋的相干旋进(coherent precession)的作用。结果,净效果是在磁共振信号中的变化,其被测量作为纵向(T1,自旋-晶格)和横向(T2,自旋-自旋)弛豫时间的缩短。

[0007] 术语“T₂”是指表征信号衰减的自旋-自旋弛豫时间常数,并可通过以下等式表示:

$$[0008] \quad M_{xy}(t) = M_{xy}(0) e^{-t/T_2}$$

[0009] 其中M_{xy}是由射频(RF)脉冲倾斜的磁化矢量的横向分量。

[0010] 以前磁纳米颗粒已经用于测量生物靶例如细菌和哺乳动物细胞。使用靶-特异性磁纳米颗粒,其加上了细胞表面生物标志物标签,由此给予磁矩。在弛豫速率R₂ = 1/T₂中的增加直接地与靶结合的纳米颗粒的数量成比例(并也指示标志物表面标志物的量)。因此R₂的变化和由此T₂的变化可用于检测在样本溶液中细胞的存在(Shao等人, Beilstein J. Nanotechnol; (2010); 1; 142-154页)。然而,在现有技术中描述的方法需要除去未结合的磁纳米颗粒以确保测定的灵敏性,所述除去一般通过过滤来完成。在检测通过运用微-MR装置完成的情况下,该装置在反应流动通路的终点需要过滤膜用于滤出的未结合的磁纳米颗粒(Lee等人, Angew Chem Int Ed Engl; (2009); 48; 5657-5660页)。

[0011] 从结合的磁纳米颗粒中除去未结合的磁纳米颗粒的需求引起许多问题。例如运用微流体性网络和过滤膜增加MR检测装置的成本。额外的过滤步骤也可增加样本制备的成本,该因素在其中可负担得起的测试技术是首要的发展中国家中尤其重要。此外,对额外的分离步骤的需求将实施诊断测试的技术员暴露于潜在危险的物质。

[0012] 发明简述

[0013] 本发明涉及通过磁共振检测在样本中的靶物质的存在的体外方法,所述方法包括:

[0014] (a) 提供包含生物样本的测试样本;

- [0015] (b) 提供多个磁纳米颗粒,其中所述磁纳米颗粒包括能够结合靶物质的结合剂;
- [0016] (c) 将测试样本与多个磁纳米颗粒接触以提供含有磁纳米颗粒和测试样本的混合物;和
- [0017] (d) 确定与样本中的靶物质结合的磁纳米颗粒对应的 T_2 弛豫时间($T_{2\text{结合}}$);
- [0018] 其中 $T_{2\text{结合}}$ 不同于未与靶物质结合的磁纳米颗粒对应的 T_2 弛豫时间($T_{2\text{自由}}$),并且其中 $T_{2\text{结合}}$ 在没有将与靶物质结合的磁纳米颗粒同未与靶物质结合的磁纳米颗粒物理上分离的情况下确定。
- [0019] 本发明还提供通过磁共振检测在生物样本中的靶物质的存在的体外方法,所述方法包括:
- [0020] (a) 提供包含生物样本和多个磁纳米颗粒的混合物,其中磁纳米颗粒包括当靶物质存在于生物样本中时能够结合靶物质的结合剂;和
- [0021] (b) 确定与在样本中的靶物质结合的磁纳米颗粒对应的 T_2 弛豫时间($T_{2\text{结合}}$);
- [0022] 其中 $T_{2\text{结合}}$ 不同于未与靶物质结合的磁纳米颗粒对应的 T_2 弛豫时间($T_{2\text{自由}}$),并且其中 $T_{2\text{结合}}$ 在没有将与靶物质结合的磁纳米颗粒同未与靶物质结合的磁纳米颗粒物理上分离的情况下确定。
- [0023] 本发明还提供了检测在生物样本中的靶物质的存在的方法,所述方法包括:
- [0024] (a) 提供来自包含生物样本和多个磁纳米颗粒的混合物的NMR数据,其中所述磁纳米颗粒包括当靶物质存在于生物样本中时能够结合靶物质的结合剂;和
- [0025] (b) 根据所述NMR数据确定与在样本中的靶物质结合的磁纳米颗粒对应的 T_2 弛豫时间($T_{2\text{结合}}$);
- [0026] 其中 $T_{2\text{结合}}$ 不同于未与靶物质结合的磁纳米颗粒对应的 T_2 弛豫时间($T_{2\text{自由}}$),并且其中通过NMR数据的处理将 $T_{2\text{结合}}$ 与 $T_{2\text{自由}}$ 区分以获得 $T_{2\text{结合}}$ 和 $T_{2\text{自由}}$ 的分开值。
- [0027] 本发明还提供了通过磁共振检测在生物样本中的靶物质的存在的体外方法,所述方法包括:
- [0028] (a) 提供包含生物样本和多个磁纳米颗粒的混合物,其中所述磁纳米颗粒包括当靶物质存在于生物样本中时能够结合靶物质的结合剂;和
- [0029] (b) 确定与在样本中的靶物质结合的磁纳米颗粒对应的 T_2 弛豫时间($T_{2\text{结合}}$);
- [0030] 其中 $T_{2\text{结合}}$ 不同于未与靶物质结合的磁纳米颗粒对应的 T_2 弛豫时间($T_{2\text{自由}}$),和其中通过NMR数据的处理将 $T_{2\text{结合}}$ 与 $T_{2\text{自由}}$ 区分以获得 $T_{2\text{结合}}$ 和 $T_{2\text{自由}}$ 的分开值。
- [0031] 本发明还提供检测生物样本中的靶物质的存在的方法,所述方法包括:
- [0032] (a) 提供来自包含生物样本和多个磁纳米颗粒的混合物的NMR数据,其中所述磁纳米颗粒包括当靶物质存在于生物样本中时能够结合靶物质的结合剂;和
- [0033] (b) 处理所述NMR数据以确定是否存在同 $T_{2\text{结合}}$ 和 $T_{2\text{自由}}$ 对应的不同 T_2 值,其中 $T_{2\text{结合}}$ 是如果靶物质存在的话,与靶物质结合的磁纳米颗粒对应的 T_2 弛豫时间,并且 $T_{2\text{自由}}$ 是未与靶物质结合的磁纳米颗粒对应的 T_2 弛豫时间。
- [0034] 生物样本优选是自哺乳动物受试者,优选人获得的样本,所述哺乳动物受试者例如被怀疑患有疾病或感染的个体。靶物质(其可以是例如细胞或病原体)可表示指示疾病或感染的靶。
- [0035] 本发明由此涉及使用磁纳米颗粒在生物样本中检测靶物质例如细胞或病原体的

方法,所述方法不需要将与靶物质结合的磁纳米颗粒同没有与靶物质结合的纳米颗粒物理分离/过滤。

[0036] 本发明人已进一步确定的是, $T_{2\text{结合}}$ 的值取决于靶物质(例如,细胞、病原体或细菌)的浓度并且因此 $T_{2\text{结合}}$ 的确定可允许确定靶物质的量(例如浓度的数量)。

[0037] 因此,本发明具有胜过需要上述分离步骤的现有技术方法的明显的优点。例如,该步骤的去除减少样本制备的时间和成本。该步骤的去除还可减少实施测试的技术员对另外潜在危险样本的暴露。此外,可消除对于高度训练的人力的需求。

[0038] 在本发明的实施方案中,靶物质是细胞和/或病原体,例如细菌细胞。

[0039] 在进一步的实施方案中,通过NMR数据的信号处理将 $T_{2\text{结合}}$ 与 $T_{2\text{自由}}$ 区分开以获得 $T_{2\text{结合}}$ 和 $T_{2\text{自由}}$ 的分离的值。信号处理优选包括将双指数拟合应用于自混合物获得的NMR数据以获得 $T_{2\text{结合}}$ 和 $T_{2\text{自由}}$ 的分离的值。

[0040] 在进一步的实施方案中,使混合物经历自旋-回波脉冲序列,特别是多回波自旋回波脉冲序列。

[0041] 在更进一步实施方案中,本发明的方法进一步包括定量在样本或混合物中靶物质的量。在此实施方案的一个方面中, $T_{2\text{结合}}$ 的值取决于混合物中靶物质的量,并且靶物质的量通过将 $T_{2\text{结合}}$ 的值与在靶物质的不同浓度下测量的 $T_{2\text{结合}}$ 的值的标准曲线比较而确定。另外或备选地, $T_{2\text{结合}}$ 的值取决于混合物中靶物质的量,并且将 $T_{2\text{结合}}$ 的值与自包含已知量的靶物质的参考样本获得的一个或多个标准值比较。

[0042] 在进一步的实施方案中,本发明的方法在微-MR装置上实施。

[0043] 在进一步的实施方案中,磁纳米颗粒包括与结合剂缀合的超顺磁颗粒。每一个磁性颗粒可包含含有超顺磁氧化铁(SPIO)的核,其中所述颗粒与结合剂缀合。

[0044] 在进一步的实施方案中,结合剂是含有对靶物质有特异性的结合位点的抗体或抗体片段。

[0045] 附图简述

[0046] 图1是显示 T_2 弛豫时间对细菌靶向的磁性纳米缀合物和细菌之间的反应的时间的线图。

[0047] 图2是对使用过滤步骤检测靶物质的过程的示意图。

[0048] 图3是对使用本发明的方法检测靶物质的过程的示意图,其中过滤步骤不是必需的。

[0049] 图4是可用于本发明的微-磁共振单元的透视分解图的示意图。

[0050] 图5是分析可用于本发明的样本和纳米颗粒的混合物的方法的流程图。

[0051] 图6是可用于本发明的微-磁共振系统的示意图。

[0052] 图7是用于管理微-核MR单元的分析数据的界面单元的示意图。

[0053] 图8是管理在微-核MR单元中生成的分析数据的界面单元的例示性环境。

[0054] 图9说明了管理在微-磁共振单元中的分析数据的方法的流程图。

[0055] 图10说明了在界面单元中处理分析数据的方法的流程图。

[0056] 图11说明了遵循实施方案使用微-磁共振系统分析至少一种流体样本和纳米颗粒的混合物的方法的流程图。

[0057] 发明详述

[0058] 本发明提供通过磁共振检测在样本中的靶物质的存在的体外方法,所述方法包括:

[0059] (a) 提供包含生物样本的测试样本;

[0060] (b) 提供多个磁纳米颗粒,其中所述磁纳米颗粒包括能够结合靶物质的结合剂;

[0061] (c) 将测试样本与多个磁纳米颗粒接触以提供含有磁纳米颗粒和测试样本的混合物;

[0062] (d) 确定与在样本中的靶物质结合的磁纳米颗粒对应的 T_2 弛豫时间($T_{2\text{结合}}$);

[0063] 其中 $T_{2\text{结合}}$ 不同于未与靶物质结合的磁纳米颗粒对应的 T_2 弛豫时间($T_{2\text{自由}}$),并且其中 $T_{2\text{结合}}$ 在没有将与靶物质结合的磁纳米颗粒同没有与靶物质结合的磁纳米颗粒物理上分离的情况下确定。

[0064] 本发明还提供通过磁共振检测在生物样本中的靶物质的存在的体外方法,所述方法包括:

[0065] (a) 提供包含生物样本和多个磁纳米颗粒的混合物,其中所述磁纳米颗粒包括当靶物质存在于生物样本中时能够结合靶物质的结合剂;和

[0066] (b) 确定与在样本中的靶物质结合的磁纳米颗粒对应的 T_2 弛豫时间($T_{2\text{结合}}$);

[0067] 其中 $T_{2\text{结合}}$ 不同于未与靶物质结合的磁纳米颗粒对应的 T_2 弛豫时间($T_{2\text{自由}}$),并且其中 $T_{2\text{结合}}$ 在没有将与靶物质结合的磁纳米颗粒同没有与靶物质结合的磁纳米颗粒物理上分离的情况下确定。

[0068] 本发明还提供了检测在生物样本中的靶物质的存在的方法,所述方法包括:

[0069] (a) 提供来自包含生物样本和多个磁纳米颗粒的混合物的NMR数据,其中所述磁纳米颗粒包含当所述靶物质存在于生物样本中时能够结合靶物质的结合剂,和

[0070] (b) 根据所述NMR数据确定与在样本中的靶物质结合的磁纳米颗粒对应的 T_2 弛豫时间($T_{2\text{结合}}$);

[0071] 其中 $T_{2\text{结合}}$ 不同于未与靶物质结合的磁纳米颗粒对应的 T_2 弛豫时间($T_{2\text{自由}}$),并且其中通过NMR数据的处理将 $T_{2\text{结合}}$ 与 $T_{2\text{自由}}$ 区分以获得 $T_{2\text{结合}}$ 和 $T_{2\text{自由}}$ 的分离的值。

[0072] 本发明还提供通过磁共振检测在生物样本中的靶物质的存在的体外方法,所述方法包括:

[0073] (a) 提供包含生物样本和多个磁纳米颗粒的混合物,其中所述磁纳米颗粒包含当靶物质存在于生物样本中时能够结合靶物质的结合剂;和

[0074] (b) 确定与在样本中的靶物质结合的磁纳米颗粒对应的 T_2 弛豫时间($T_{2\text{结合}}$);

[0075] 其中 $T_{2\text{结合}}$ 不同于未与靶物质结合的磁纳米颗粒对应的 T_2 弛豫时间($T_{2\text{自由}}$),并且其中通过NMR数据的处理将 $T_{2\text{结合}}$ 与 $T_{2\text{自由}}$ 区分以获得 $T_{2\text{结合}}$ 和 $T_{2\text{自由}}$ 的分离的值。

[0076] 本发明还提供检测在生物样本中的靶物质的存在的方法,所述方法包括:

[0077] (a) 提供来自包含生物样本和多个磁纳米颗粒的混合物的NMR数据,其中所述磁纳米颗粒包含当靶物质存在于生物样本中时能够结合靶物质的结合剂;和

[0078] (b) 处理NMR数据以确定是否存在同 $T_{2\text{结合}}$ 和 $T_{2\text{自由}}$ 对应的不同 T_2 值,其中 $T_{2\text{结合}}$ 是如果靶物质存在的话,与靶物质结合的磁纳米颗粒对应的 T_2 弛豫时间,和 $T_{2\text{自由}}$ 是未与靶物质结合的磁纳米颗粒对应的 T_2 弛豫时间。

[0079] 当将磁纳米颗粒放置在外场中时,每个颗粒产生局部磁场,其增加场的不均一性。

当水分子散布在所述纳米粒子的附近时,这具有扰乱水质子自旋的相干旋进的作用。所以,净效果是在磁共振信号中的变化,其被测量作为纵向(T_1 ,自旋-晶格)和横向(T_2 ,自旋-自旋)弛豫时间的缩短。

[0080] 本发明人已经确定当磁纳米颗粒与靶物质,例如细胞结合时降低与磁纳米颗粒相关的 T_2 弛豫值。更具体而言,本发明人已经证明当将包含对靶物质,例如细胞类型有特异性的结合剂的磁纳米颗粒在靶物质(例如靶细胞)存在下孵育时,可得到两个 T_2 测量。第一个 T_2 值(通常较低值)同没有与所述物质结合的纳米颗粒相关的 T_2 值(本文中称为 $T_{2\text{自由}}$)对应。第二个 T_2 值(通常较高值)同与所述物质结合的纳米颗粒相关的 T_2 值(本文中称为 $T_{2\text{结合}}$)对应。

[0081] 本发明人已经进一步确定的是,在没有将未与靶物质(例如细胞)结合的纳米颗粒物理分离的情况下有可能测量在靶物质(例如细胞)和磁纳米颗粒的混合物中的 $T_{2\text{自由}}$ 和 $T_{2\text{结合}}$ 的值。这可通过处理来自混合物的NMR数据以获得 $T_{2\text{自由}}$ 和 $T_{2\text{结合}}$ 二者的值来实现。处理步骤优选包括将双指数拟合应用于从混合物获得的NMR数据。所述双指数拟合迎合这样的事实:两个不同的 T_2 值可存在于经历NMR测量实验的混合物中。

[0082] 可用于确定 $T_{2\text{自由}}$ 和 $T_{2\text{结合}}$ 的值的的双指数拟合等式的实例显示于下面的等式(1)中:

$$[0083] \quad y = A1 * \exp -(x/\tau1) + A2 * \exp -(x/\tau2) + O \quad (\text{等式1})$$

[0084] 其中:

[0085] $A1, A2$ =在时间零点时分量1和2的振幅

[0086] $\tau1, \tau2$ =分量1和2的 T_2 衰减常数

[0087] O =偏移量。

[0088] 通常,这些非线性拟合以迭代的方式使用例如,Levenberg-Marquardt非线性最小二乘拟合算法进行。所述迭代的过程以未知的猜测开始。在此情况下,所述未知的是相关振幅 $A1, A2$;弛豫时间 $\tau1$ 和 $\tau2$ 以及偏移量 O 。所有这些通过具有针对其迭代的过程的终止标准的算法而确定。这样的拟合算法作为在大多数市售可得的弛豫测量计(relaxometer)上的标准常规是可得的。

[0089] 在 T_2 值的NMR确定中, T_2 值可使用在将合适的脉冲序列应用于样本期间获得的NMR信号而确定。在优选的实施方案中,所述序列是多回波自旋回波脉冲序列。

[0090] 合适的序列的实例是Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG)自旋回波序列:

[0091] $\{RD - 90_0 - \tau - [(180_{90} - \tau -)DE (180_{90} - \tau -) \text{asd} - \tau -]\}_N \text{NS}$

[0092] 其中:

[0093] RD 是循环延迟, τ 是延迟间隔, DE 在取样回波之前伪回波(dummy echoe)的数量, N 是采集点的数量, NS 是对信号平均的扫描的数量和“asd”指示单数据点的获取。

[0094] 实例参数是: $RD = 6 \text{ s}; \tau = 5 \text{ ms}, DE = 0, N = 700, NS = 8$ 。然而,应该理解的是,技术人员可轻易地确定允许确定 T_2 值的可用于本发明的其它序列。

[0095] 本发明人已经进一步确认 $T_{2\text{结合}}$ 的值取决于靶物质(例如细胞、病原体或细菌)的浓度。本发明可因此进一步用于定量可存在于样本中的靶物质的量(例如细胞、病原体或细菌的数量或浓度),不需要过滤未结合的纳米缀合物。

[0096] 因此,在实施方案中, $T_{2\text{结合}}$ 的值取决于在测试样本/混合物中靶物质的量,并且测试样本中靶物质的量通过将 $T_{2\text{结合}}$ 的值与在靶物质的不同浓度下测量的 $T_{2\text{结合}}$ 值的标准曲线比较而确定。

[0097] 在进一步的实施方案中, $T_{2\text{结合}}$ 的值取决于在样本中靶物质的量, 并将 $T_{2\text{结合}}$ 的值与自包括已知量的靶物质的参考样本获得的一个或多个标准值比较。

[0098] 由本发明产生的优点可通过将图2上表示的工作流示意图与图3的工作流示意图比较而理解。图2是使用过滤步骤检测靶物质的过程的示意图。图3是使用本发明的方法检测靶物质的过程的示意图, 其中过滤步骤并非必需的必要条件。

[0099] 贯穿本申请, 涉及了确定 T_2 值。然而, 应该理解因为 $T_2 = 1/R_2$ (其中 R_2 是弛豫速率常数), 所以本发明的方法可通过确定 R_2 实现。因此, 通过确定 R_2 值 (例如 $R_{2\text{结合}}$ 和 $R_{2\text{自由}}$) 确定在样本中的靶物质的存在和/或量意欲在本发明的范围内, 因为 R_2 是 T_2 的倒数。例如, R_2 值的确定可通过在等式中用 $1/R_2$ 替换 T_2 常数而进行。因此, 通过检测 $R_{2\text{结合}}$ 和 $R_{2\text{自由}}$ 的值而检测靶物质的存在是在本发明的范围内, 因为本文中对确定 T_2 值的提及也可看作为确定对应的 R_2 值并且反之亦然。

[0100] 可用于本发明的磁纳米颗粒是本领域周知的。纳米颗粒包括但不限于磁性或超顺磁纳米颗粒。纳米颗粒可用作调节邻近分子的自旋-自旋弛豫时间的接近的传感器, 所述邻近分子的自旋-自旋弛豫时间可使用MRI和其它NMR弛豫测量计而测量。纳米颗粒适宜是物理上或化学上稳定的, 生物相容的和环境上安全的。

[0101] 磁纳米颗粒理想地应该具有强磁矩以诱导显著的 T_2 变化, 同时还显示超顺磁性行为以避免自发的磁性聚集。此外纳米颗粒应该用合适的涂层涂覆以防止在水性溶液中聚集。合适的涂层一般是亲水的和生物相容的。涂层应该优选提供附接一个或多个结合剂例如抗体、DNA、蛋白肽或小分子的手段。

[0102] 磁纳米颗粒的实例包括交联的氧化铁 (CLIO) 纳米颗粒、胺化的CLIO (氨基-CLIO) 纳米颗粒、锰掺杂的氧化铁磁纳米颗粒、超顺磁性氧化铁 (SPIO) 颗粒和元素铁核/亚铁盐壳纳米颗粒。这样的纳米颗粒可如上面描述合适地涂覆。磁纳米颗粒的实例, 及其在体外核磁共振检测中的用途, 被提供于由 Jered B. Haun、Tae-Jong Yoon、Hakho Lee 和 Ralph Weissleder 撰写的题目是“Magnetic Nanoparticle Biosensors (磁纳米颗粒生物传感器)”的出版物中 (发表于 Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology; 第2卷; 第3期; 2010年5月/6月; 291-304页)。另外的实例被提供于例如由 Vasiliki Demas 和 Thomas J Lowery 撰写的题目是“Magnetic Resonance for In-Vitro Medical Diagnostics: Superparamagnetic Nanoparticle-Based Magnetic Relaxation Switches (用于体外医学诊断的磁共振: 基于超顺磁纳米颗粒的磁性弛豫开关)” (发表于 New Journal of Physics: 第13卷, 第2期 (2011), pp. 025005)。

[0103] 为了纳米颗粒与靶物质结合, 纳米颗粒可用靶物质 (例如, 细胞、病原体或细菌) 的特异性结合剂标记或与其缀合。结合剂的性质和结构将取决于要检测的靶的性质。这样的结合剂的实例包括: 识别并结合靶物质上的靶部分的抗体; 与DNA-或RNA-靶互补的寡核苷酸或DNA序列; 例如与靶蛋白、细菌、病毒、酵母或真菌结合的DNA-或RNA-适体; 例如与靶蛋白、细菌、病毒、酵母或真菌结合的蛋白或肽; 包含非天然氨基酸的肽, 其可具有对靶的增强的结合和/或具有改进的环境稳定性; 可与靶结合的小分子或小分子的组合。所述部分可通过共价或非共价键与纳米颗粒 (例如纳米颗粒的壳) 连接。所述部分可通过合适的官能团与纳米颗粒连接。合适的官能团可包括 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-SS-$ 、 $-NH-$ 、 $-NHC(O)-$ 、 $-(O)CNH-$ 、 $-NHC(O)(CH_2)nC(O)-$ 、 $-(O)C(CH_2)nC(O)NH-$ 、 $-NHC(O)(CH_2)nC(O)NH-$ 、 $-C(O)O-$ 、 $-OC(O)-$ 、 $-NHNH-$ 、 $-C$

(O) S-、-SC(O)-、-OC(O)(CH₂)_n(O)-、-O(CH₂)_nC(O)O-、-OC(O)(CH₂)_nC(O)-、-C(O)(CH₂)_nC(O)O-、-C(O)(CH₂)_nC(O)-、-NH(CH₂)_nC(O)-、-C(O)(CH₂)_nNH-、-O(CH₂)_nC(O)-、-C(O)(CH₂)_nO-、-S(CH₂)_nC(O)-、-C(O)(CH₂)_nS-、-NH(CH₂)_n-、-(CH₂)_nNH-、-O(CH₂)_n-、-(CH₂)_nO-、-S(CH₂)_n-或-(CH₂)_nS-，其中各个n可以是1-100（例如，n可以是1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、96、97、98、99）。将结合剂缀合至纳米颗粒的方法是本领域已知的，其实例在上面提及的出版物中提供。另外的实施例被提供于，例如美国专利号US7829350B2。

[0104] 在优选的实施方案中，结合剂是抗体。术语“抗体”描述无论天然产生的，或部分地或全部地合成产生的免疫球蛋白。所述抗体可以是单克隆的或多克隆的，并可以通过本领域周知的技术制备，例如免疫接种宿主和收集血清（多克隆的），或通过制备连续杂交细胞系并收集分泌的蛋白（单克隆的），或通过克隆和表达核苷酸序列或其诱变形式，所述核苷酸序列或其诱变形式编码至少天然抗体特异性结合必须的氨基酸序列。术语“抗体”也涵盖包含抗体的抗原结合位点的任何多肽或蛋白。包含抗体的抗原结合位点的抗体片段包括但不限于诸如Fab、Fab'、Fab'-SH、scFv、Fv、dAb、Fd和双抗体的分子。

[0105] 靶物质是这样的物质，其可存在于要检测的生物样本中，并且对于该生物样本而言，知道所述靶物质的存在对例如达到临床诊断是需要的。靶物质的实例包括细胞（例如表达特定的目的生物标志物的细胞）、细菌、病原体、病毒、寄生虫、酵母或真菌。

[0106] 可通过本发明检测的细菌的实例包括革兰氏阳性细菌例如金黄色葡萄球菌或枯草芽孢杆菌；革兰氏阴性细菌例如大肠埃希氏菌或铜绿假单胞菌；和抗酸的杆菌例如分枝杆菌的菌株，如结合分枝杆菌。

[0107] 可通过本发明检测的病原体的实例包括细菌、真菌、寄生虫、酵母和病毒。

[0108] 可通过本发明检测的细胞的实例包括细菌、肿瘤细胞、干细胞、哺乳动物细胞和其它细胞。

[0109] 在磁纳米颗粒上的结合剂能够与目的靶物质特异性地结合。结合剂通常与靶物质上的靶位点结合。靶位点可以是，例如，表征靶物质的生物标志物。

[0110] 靶位点可以包括靶蛋白。本发明的实施方案的靶蛋白可以存在于靶物质的表面上。在一些实施方案中，靶蛋白可以不固有地存在于生物样本的表面上并且所述生物样本可必须经处理以使得靶蛋白在表面上可得。在一些实施方案中，靶蛋白可以在组织中、在细胞表面上或在细胞内。

[0111] 在一些实施方案中，靶位点（例如蛋白）可提供关于在生物样本中存在或不存在靶物质的信息。在另一实施方案中，靶蛋白可提供关于生物样本的状态的信息。例如，如果本文公开的方法可用于检测这样的靶蛋白，其可帮助比较不同类型的细胞，比较不同发育阶段，检测疾病或异常的存在或确定疾病或异常的类型。

[0112] 合适的靶蛋白可包括肽、蛋白（例如，抗体、亲和体（affibody）或适体）、酶、配体、受体、抗原或半抗原的一种或多种。上述靶蛋白的一种或多种可以是特定细胞特有的，而其它靶蛋白可以与特定的疾病或病况相关。在一些实施方案中，存在于样本中靶物质（例如细胞、细菌或病原体）上的可使用本文中公开的方法检测和分析的靶蛋白可包括但不限于预后标志物、预测标志物、激素或激素受体、淋巴、肿瘤标志物、细胞周期相关的标志物、神经组织和肿瘤标志物或簇分化标志物。

[0113] 预后标志物的合适实例可包括酶靶例如半乳糖转移酶II、神经元特异性烯醇酶、质子ATP酶-2或酸性磷酸酶。预后蛋白或基因标志物的其它实例包括Ki67、细胞周期蛋白E、p53、cMet。

[0114] 预测标志物(药物反应)的合适实例可包括蛋白或基因靶例如EGFR、Her2、ALK。

[0115] 激素或激素受体的合适实例可包括人绒毛膜促性腺激素(HCG)、促肾上腺皮质激素、癌胚抗原(CEA)、前列腺特异性抗原(PSA)、雌激素受体、孕酮受体、雄激素受体、gC1q-R/p33补体受体、IL-2受体、p75神经营养蛋白受体、PTH受体、甲状腺激素受体或胰岛素受体。

[0116] 淋巴的合适实例可包括 α -1-抗胰凝乳蛋白酶、 α -1-抗胰蛋白酶、B细胞靶、bcl-2、bcl-6、B淋巴细胞抗原36 kD、BM1(骨髓样靶)、BM2(骨髓样靶)、半乳凝素-3、粒酶B、HLA I类抗原、HLA II类(DP)抗原、HLA II类(DQ)抗原、HLA II类(DR)抗原、人嗜中性粒细胞防御素、免疫球蛋白A、免疫球蛋白D、免疫球蛋白G、免疫球蛋白M、 κ 轻链、 λ 轻链、淋巴细胞/组织细胞抗原、巨噬细胞靶、胞壁酸酶(溶菌酶)、p80间变性淋巴瘤激酶、血浆细胞靶、分泌的白细胞蛋白酶抑制剂、T细胞抗原受体(JOVI 1)、T细胞抗原受体(JOVI 3)、末端脱氧核苷酸转移酶或非簇生B细胞靶。

[0117] 肿瘤标志物的合适的实例可包括甲胎蛋白、载脂蛋白D、BAG-1(RAP46蛋白)、CA19-9(sialyl lewisa)、CA50(癌相关粘蛋白抗原)、CA125(卵巢癌抗原)、CA242(肿瘤相关粘蛋白抗原)、嗜铬粒蛋白A、簇蛋白(载脂蛋白J)、上皮膜抗原、上皮相关的抗原、上皮特异性抗原、巨囊性病流体蛋白-15、肝细胞特异性抗原、调蛋白、人胃粘蛋白、人乳脂肪小球、MAGE-1、基质金属蛋白酶、黑素A、黑色素瘤靶(HMB45)、间皮素、金属硫蛋白、小眼球转录因子(MITF)、Muc-1核心糖蛋白、Muc-1糖蛋白、Muc-2糖蛋白、Muc-5AC糖蛋白、Muc-6糖蛋白、髓过氧化物酶、Myf-3(横纹肌肉瘤靶)、Myf-4(横纹肌肉瘤靶)、MyoD1(横纹肌肉瘤靶)、肌红蛋白、nm23蛋白、胎盘碱性磷酸酶、前白蛋白、前列腺特异性抗原、前列腺酸性磷酸酶、前列腺抑制素肽、PTEN、肾细胞癌靶、小肠粘蛋白状抗原、四连接素、甲状腺转录因子-1、基质金属蛋白酶1的组织抑制剂、基质金属蛋白酶2的组织抑制剂、酪氨酸酶、酪氨酸酶相关蛋白-1、绒毛蛋白或血管假性血友病因子(von Willebrand factor)。

[0118] 细胞周期相关标志物的合适实例可包括凋亡蛋白酶活化因子-1、bcl-w、bcl-x、溴代脱氧尿苷、CAK(cdk-活化激酶)、细胞凋亡易感性蛋白(CAS)、半胱天冬酶2、半胱天冬酶8、CPP32(半胱天冬酶-3)、CPP32(半胱天冬酶-3)、细胞周期蛋白依赖性激酶、细胞周期蛋白A、细胞周期蛋白B1、细胞周期蛋白D1、细胞周期蛋白D2、细胞周期蛋白D3、细胞周期蛋白E、细胞周期蛋白G、DNA断裂因子(N-末端)、Fas(CD95)、Fas相关的死亡结构域蛋白、Fas配体、Fen-1、IPO-38、Mcl-1、微型染色体维持蛋白、错配修复蛋白(MSH2)、聚(ADP-核糖)聚合酶、增殖细胞核抗原、p16蛋白、p27蛋白、p34cdc2、p57蛋白(Kip2)、p105蛋白、Stat 1 α 、拓扑异构酶I、拓扑异构酶II α 、拓扑异构酶III α 或拓扑异构酶II β 。

[0119] 簇分化标志物的合适实例可包括CD1a、CD1b、CD1c、CD1d、CD1e、CD2、CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD3 γ 、CD4、CD5、CD6、CD7、CD8 α 、CD8 β 、CD9、CD10、CD11a、CD11b、CD11c、CDw12、CD13、CD14、CD15、CD15s、CD16a、CD16b、CDw17、CD18、CD19、CD20、CD21、CD22、CD23、CD24、CD25、CD26、CD27、CD28、CD29、CD30、CD31、CD32、CD33、CD34、CD35、CD36、CD37、CD38、CD39、CD40、CD41、CD42a、CD42b、CD42c、CD42d、CD43、CD44、CD44R、CD45、CD46、CD47、CD48、CD49a、CD49b、CD49c、CD49d、CD49e、CD49f、CD50、CD51、CD52、CD53、CD54、CD55、CD56、CD57、CD58、CD59、

CDw60、CD61、CD62E、CD62L、CD62P、CD63、CD64、CD65、CD65s、CD66a、CD66b、CD66c、CD66d、CD66e、CD66f、CD68、CD69、CD70、CD71、CD72、CD73、CD74、CDw75、CDw76、CD77、CD79A、CD79B、CD80、CD81、CD82、CD83、CD84、CD85、CD86、CD87、CD88、CD89、CD90、CD91、CDw92、CDw93、CD94、CD95、CD96、CD97、CD98、CD99、CD100、CD101、CD102、CD103、CD104、CD105、CD106、CD107a、CD107b、CDw108、CD109、CD114、CD115、CD116、CD117、CDw119、CD120a、CD120b、CD121a、CDw121b、CD122、CD123、CD124、CDw125、CD126、CD127、CDw128a、CDw128b、CD130、CDw131、CD132、CD134、CD135、CDw136、CDw137、CD138、CD139、CD140a、CD140b、CD141、CD142、CD143、CD144、CDw145、CD146、CD147、CD148、CDw149、CDw150、CD151、CD152、CD153、CD154、CD155、CD156、CD157、CD158a、CD158b、CD161、CD162、CD163、CD164、CD165、CD166和TCR- ζ 。

[0120] 其它合适的靶蛋白包括着丝粒蛋白-F (CENP-F)、巨蛋白、外皮蛋白、核纤层蛋白A&C (XB 10)、LAP-70、粘蛋白、核孔复合体蛋白、p180片层体蛋白、ran、组织蛋白酶D、Ps2蛋白、Her2-neu、P53、S100、上皮靶抗原(EMA)、TdT、MB2、MB3、PCNA、Ki67、细胞角蛋白、PI3K、cMyc或MAPK。

[0121] 还有其它合适的靶蛋白包括Her2/neu (在乳腺癌和胃癌中过表达的表皮生长因子,通过单克隆抗体的疗法减缓肿瘤生长);EGF-R/erbB (表皮生长因子受体);ER (对一些乳腺癌肿瘤的生长必须的雌激素受体,其位于核中并用ISH检测用于作出限制在阳性患者中的雌激素的疗法的决定);PR (孕酮受体是与DNA结合的激素);AR (雄激素受体涉及雄激素依赖性肿瘤生长); β -联蛋白 (在癌中的癌基因从细胞膜易位至细胞核,所述癌基因在细胞黏附和作为潜在的基因调控蛋白二者方面起作用);磷酸- β -联蛋白:磷酸化的(β -联蛋白的形式在胞质溶胶中降解并且不易位至核);GSK3 β (糖原合酶激酶-3 β 蛋白在Wnt通路中将 β -联蛋白磷酸化,标记磷酸- β -联蛋白以在原口动物(protozoa)中快速降解);PKCB (介质G蛋白偶联受体);NF κ B (当易位至核时炎症的核因子 κ B标志物);VEGF (与血管发生相关的血管内皮生长因子);E-钙粘蛋白 (在上皮细胞上表达的细胞与细胞相互作用分子,该功能在上皮癌中缺失);c-met (酪氨酸激酶受体)。

[0122] 在某些实施方案中,靶物质上的靶位点是多糖抗原。

[0123] 测试样本可包括生物样本或由其组成。依照本发明的一个实施方案的生物样本优选是流体。生物样本优选为自生物受试者获得的样本,例如体内或体外获得的生物组织或流体源的样本。生物样本的合适实例可包括但不限于血液、唾液、脑脊髓液、胸水、乳、淋巴、痰、精液、尿、粪、泪、针抽吸物;皮肤、呼吸道、肠道和泌尿生殖道的外部切片;肿瘤、器官、细胞培养物或固体组织切片。在一些实施方案中,生物样本可原样分析,即,不收获和/或分离目的靶物质。在备选的实施方案中,样本可在与磁纳米颗粒混合之前处理,例如通过在分析之前收获样本或通过加入合适的缓冲液或稳定剂等。

[0124] 生物样本可包括上述的样本的任一种,不管它们的物理条件。在一些实施方案中,生物样本可包括实际上与样本并非天然混合的化合物例如防腐剂、抗凝剂、缓冲液、固定剂、营养素、抗生素等等。

[0125] 在优选的实施方案中,生物样本包含血液、痰或任何体液或细针抽吸物(FNA)。

[0126] 本发明的方法使用磁共振(MR)装置实施。磁共振可使用MRI扫描仪、NMR光谱法和/或NMR弛豫测量学(NMR relaxometry)检测。所有这些技术已用于测量自旋-自旋弛豫时间(T_2)。临床和实验的MRI扫描仪使用通过超导的磁铁生成的强磁场。然而,MRI扫描仪遭受高

运行成本、庞大的仪器尺寸和对大样本体积的需要的困扰。对于护理诊断而言, Benchtop弛豫测量计提供了更有吸引力的备选方案(参见例如Haun等人, *Nanomedicine and Nanobiotechnology*; 第2卷, 第3期, 2010年5月/6月, 291-304页;和Perez等人, *Nat. Biotechnol.* 2002, 20: 816-820页)。Benchtop系统以较低NMR频率(100 kHz-50 MHz)运行并装备有永久的、低场磁铁用于场生成。

[0127] 在近年来,基于芯片的NMR检测系统(称为微MR)已经开发以在较小的样本体积上进行多路的诊断性MR测量(参见例如Haun等人, *Nanomedicine and Nanobiotechnology*; 第2卷, 第3期, 2010年5月/6月, 291-304页;Lee等人, *Nat. Med.* 2008, 14:869-874页; Lee等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2009, 48: 5657-5660页;和Lee等人, *Angew. Chem. Int. Ed Engl* 2009, 48: 5657-5660页)。

[0128] 在优选的实施方案中,本发明的方法使用微MR装置实施。微MR装置优选包括用于射频(RF)激发和NMR信号检测二者的一个或多个微线圈、NMR光谱仪和微流体性网络。

[0129] 图4是用于依据实施方案分析至少一种流体样本和纳米颗粒的混合物的微-核磁共振(MR)单元的透视分解图的示意图。配置微-核MR单元102以接收至少一种流体样本和纳米颗粒的混合物。当使纳米颗粒经受在微-核MR单元例如微-核MR单元102中的磁场时,它们被磁化。纳米颗粒的磁矩按磁场线排列并产生磁通量。每一个纳米颗粒产生磁偶极,其导致磁场梯度的形成。磁场梯度产生磁场中的不均一性,其改变分子中邻近的质子的核自旋的旋进频率。这导致磁共振信号的变化,其可通过磁共振成像或核磁共振技术测量。测量的磁共振信号可被看作为纵向或自旋-晶格弛豫时间 T_1 和横向或自旋-自旋弛豫时间 T_2 的缩短。纳米颗粒的磁性弛豫性质取决于颗粒弛豫率(relaxivity)和纳米颗粒的环境,例如纳米颗粒与靶物质例如细胞/细菌/病原体结合或不结合,这可影响横向弛豫($R_2 = 1/T_2$)。

[0130] 微-核MR单元102包括磁铁104、微-MR探测器106、箱108和控制单元110。微-核MR单元102可以是集成的和便携式装置,其用于实施混合物的分析。微-核MR单元102可具有缩小的尺寸,因为小型化的NMR系统元件例如磁铁104、微-MR探测器106、箱108和控制单元110的集成。磁铁104可以是永久磁铁或便携式永久磁铁。在一个实施方案中,磁铁104可以是多个磁铁的组合件以产生更高的磁场。可将磁铁104安置在微-MR探测器106周围。在一个实施方案中,磁铁104可包括通道112,通过该通道112可布置微-MR探测器106以将磁铁104安置在微-MR探测器106的周围。然而,可以预期的是,磁铁104可具有任何其它配置以安置在微-NMR探测器106的周围或与其毗连。微-MR探测器106可通过将微线圈114安置在微流体性导管116周围而装配。微线圈114可以是一个微线圈或多个微线圈组例如螺线管线圈。例如,微线圈114可以通过将细铜线缠绕在聚乙烯管周围并随后浸于聚合物材料例如,聚二甲基硅氧烷中而装配。微-MR探测器106可以呈小型化的形式,因此可表现为微-MR芯片。微-核MR单元102包括与具有范围在20-500微米的内径的微-MR线圈组合的高稳定性永久磁铁以相对于桌面光谱仪增加NMR检测的灵敏性几个数量级。可以想象的是,具有其它配置的微-线圈可用于微-NMR探测器106。配置微-流体性导管116以在内部接纳容器118。至少一种样本和纳米颗粒可以被引入容器118。将至少一种样本与磁纳米颗粒混合以在微-流体性导管116中形成混合物120。微-流体性导管116在传感的过程中提供了重要的功能,包括:处理流体样本、将磁纳米颗粒与样本可重复的混合、将等分试样分配到不同线圈用于平行传感和将样本限制于给定微-线圈的最灵敏的区域。

[0131] 磁铁104产生在微-MR探测器106周围的磁场。当靶物质存在时,形成纳米颗粒与靶物质(例如细胞)的簇。在流体样本中例如靶细胞的存在检测是由于从基础分析物(即,未反应的纳米颗粒)到当流体样本含有特异性靶(在纳米颗粒分析物反应完成之后)时的分析物的T₂ (即,自旋-自旋弛豫时间)变化的现象所致。基本上,在激发脉冲之后,观察到的横向磁化稍后以特有的指数的“自由诱导衰减”(FID)而衰减。这包括自旋-自旋弛豫和因磁场不均一性的存在所致的弛豫的组合。当在单激发脉冲之后加入一束回聚脉冲时,获得“自旋回波”。这些自旋回波以更加慢的被称为R₂(自旋-自旋弛豫速率)的指数速率衰减。

[0132] 基础分析物主要包括已经用与靶物质(例如生物标志物分子)结合的特异性剂活化的未成簇的纳米颗粒。在靶细胞的情况下,这些纳米颗粒与例如在细胞的细胞膜上的结合位点结合,因此使纳米颗粒在彼此的封闭区内成簇。同结合的纳米颗粒对应的弛豫时间(T₂)不同于同未结合的纳米颗粒对应的弛豫时间(T₂)。微-线圈114通过控制单元110刺激达预定的时间以生成信号例如射频(RF)信号并发送至混合物。混合物随后生成随时间衰减的NMR信号。因此结合的纳米颗粒相对未结合的纳米颗粒的这种弛豫速率变化可以用于在上面描述的纳米颗粒和样本的混合物中检测靶物质(例如细胞)的存在。高弛豫率纳米颗粒的使用允许检测流体样本中极少数量的靶细胞,这使得该测试成为非常灵敏的测试。记录在混合物中靶细胞和靶分析物检测到的存在。如上面详细描述,本发明的方法可用于检测同一样本中的T_{2结合}和T_{2 free}二者,并可以进一步用于定量样本中的靶物质的量。

[0133] NMR信号包括与混合物相关的分析数据。NMR信号通过控制单元110测量。控制单元110包括微-控制器122,其控制控制单元110的所有元件的全面操作。微-控制器122处理在控制单元110接收的数据,并与外部终端通信用于数据转移和用户控制。对于发送至混合物必需的RF信号由发生器124(即RF发生器)基于来自微-控制器122的指令而生成。RF信号随后通过收发器126例如RF收发器发送。RF信号可使用存在于收发器126中的电压控制器开关调制以发送用于测量NMR信号的脉冲序列。NMR信号被接收于收发器126中并被处理用于外差检测。外差检测的处理涉及在低噪放大器中放大,接着通过混频器将频率向下转换为音频。其后向下转换的信号通过低通滤波器和放大器调节。将向下转换的信号送到数据获取单元128用于数字化。也有可能带通过滤数据和(使用高保真度、高取样速率模拟数字转换器)直接以NMR频率取样。数据获取单元128包括模拟-数字转换器(ADC)。所述ADC进一步将信号转变为数字化信号并由此存储自ADC获得的结果。微-控制器122处理数字化信号以获得分析数据并传送至外部终端例如计算机装置。在一个实施方案中,控制单元110可被集成在集成电路芯片(IC)中。当存在来自小流体样本的低NMR信号水平时和在因由磁铁104引起的不均一性所致的信号快速衰减期间可配置IC芯片以支持NMR测量。

[0134] 此外,微-核MR单元102的箱108可用于盖住磁铁104和微-MR探测器106以保护这些元件免遭暴露于外部环境。

[0135] 图5说明了用于依据一个实施方案分析纳米颗粒和至少一种测试样本的混合物的方法的流程图。在方框200中,测试样本和纳米颗粒被引入容器。容器被容纳在微-核MR单元的微-MR探测器内。在方框202中,在容器中,将至少一种测试样本和纳米颗粒混合。在方框204中,将邻近于微-MR探测器放置的磁铁随后用于在装有容器的微-MR探测器周围产生磁场。在方框206中,在与流体样本中的靶物质(例如细胞)结合时形成纳米颗粒的簇。随后通过控制单元刺激微线圈用于生成RF信号。在方框208中,将这些RF信号发送至混合物。在方

框210中,随后,测量自旋-自旋弛豫时间 $T_{2\text{结合}}$ 和 $T_{2\text{自由}}$ (或,在备选方案中,对应的弛豫速率 R_2 ,其中 $R_2 = 1/T_2$)以检测在混合物中靶物质(例如细胞)的存在。在方框212中,随后记录检测到的靶物质的存在(例如细胞)并随后使用。

[0136] 在微-核MR单元中进行的分析在性质上可以是预试验的,并且可包括例如结核病分析或细胞筛选。分析数据可能需要存储在一个位置用于未来用途和检索用于进一步的检查或与其它测试结果和/或数据组合。图6是包括按一个实施方案与界面单元通信的微-核MR单元的微-磁共振系统的示意图。获得的分析数据通过界面单元302接收。界面单元302可通过网络例如有线或无线网络与微-核MR单元102通信。所述无线网络可包括但不限于蓝牙®无线网络或Wi-Fi®网络。在另一情况下,可使用通用串行总线将分析数据传送至界面单元302。可配置界面单元302以处理分析数据。通过NMR信号接收的分析数据可以是与在至少一种流体样本和纳米颗粒的混合物上进行的分析测试相关的原始数字化数据。界面单元302处理分析数据以便将其呈现给界面单元302的用户。可处理分析数据以将分析数据显示给用户。用户可以是例如医学专家、医生和与不同应用相关的分析员。分析数据可以以下形式显示:例如,血脂分布概况或在血液样本中各种生物靶或分子的存在或水平的显示。分析数据可以以数字值和图表的形式显示。此外,分析数据可通过界面单元302处理成通用的或标准的或相容的形式,使得分析数据可以集成入其它信息系统。

[0137] 可随后将处理的分析数据传送至数据存储系统304。界面单元302通过网络与数据存储系统304通信。该网络可以是有线或无线网络。该无线网络可包括例如但不限于广域网(WAN)、广域网(WLAN)、局域网(LAN)、无线都市域网(无线MAN)和蜂窝或移动网络。数据存储系统304接收并储存处理的分析数据。该处理的分析数据可随后基于需要检索。在另一情况下,可将处理的分析数据传送至另一计算装置用于进一步的检查以实施其它医学诊断测试。这与图7联合更详细地解释。

[0138] 图7说明了根据一个实施方案用于管理微-核MR单元的分析数据的界面单元。该界面单元302可配置于用户装置例如但不限于移动装置、个人数字助手(PDA)和个人电脑中。在一个实施方案中,该界面单元302可以是在用户装置中运行的应用。界面单元302包含配置以接收来自微-核MR单元102的分析数据的数据处理器306。分析数据可以与不同受试者(例如患者)相关。分析数据在响应在微-核MR单元102中针对一个或多个不同受试者的至少一种测试样本和纳米颗粒的混合物而进行的分析时生成。可配置数据处理器306以控制基于用户输入在微-核MR单元102中进行的分析。可配置数据处理器306以处理分析数据以通过用户界面308向用户显示分析数据。用户可以是例如医学专家、医生或与不同应用相关的分析员。分析数据可以以下形式显示:例如血脂分布概况或在血液样本中各种生物靶或分子的存在或水平的显示。分析数据可以以数字值和/或图表的形式显示。

[0139] 如先前提及,分析数据可以从不同受试者接收并因此可需要建立分析数据和受试者之间的关系。为此目的,数据处理器306将处理的分析数据与从其获得流体样本的受试者映射(map)。进行映射以定义处理的分析数据和受试者之间的关系。当流体样本被接收在微-核MR单元102内时受试者的信息可最初通过数据处理器306接收。受试者信息,例如患者信息,可包括个人细节、疾病的类型、健康史和/或其他患者人口统计学细节。

[0140] 在一个实施方案中,界面单元302接收受试者的信息。受试者的信息可以由在微-核MR单元102(在图4和6中所示)中实施分析的技术员或实验室分析员通过用户界面308输

入。一旦接收到受试者的信息,那么数据处理器306将受试者的信息附加至与受试者的至少一种流体样本相关的处理的分析数据。受试者的信息可自动地或基于用户输入附加。处理的分析数据和附加的受试者的信息可被存储在界面单元302的存储器310中。在另一实施方案,可将受试者的信息和处理的分析数据分开存储。可存在或存储映射表,其指示了处理的分析数据和受试者的信息之间的关系。在一个实施方案中,可加密处理的分析数据和受试者的信息。可使用本领域已知的任何加密技术进行加密。例如,可将受试者的信息和处理的分析数据的一部分加密。

[0141] 可存在通信装置312以通过网络将处理的分析数据(例如,具有附加的受试者的信息的分析数据)通信或发送至数据存储系统例如数据存储系统304。通信装置312可包含发送器和接收器用于实施数据的发送和接收。可配置接收器以接收来自微-核MR单元102的分析数据。然而可预期的是,通信装置312可具有适合用于数据的发送和接收的其它任何配置。

[0142] 现参照图8中说明的例示性环境500,界面单元可用于管理在微-核MR单元中生成的分析数据。界面单元502可被配置在与微-核MR单元506可通信上连接的移动装置504中。移动装置504可以是PDA、智能手机或任何其它装置。微-核MR单元506包括经配置以容纳装有至少一种流体样本和纳米颗粒的混合物的容器的微流体性导管116的开口508。微-核MR单元506分析混合物。一旦进行分析,通过在微-核MR单元506中的收发器510将分析数据通信至移动装置504中的界面单元502。微-核MR单元506可经历不同外界干涉例如射频(RF)干涉并由此产生的分析数据可以是误差倾向的。因此干涉屏蔽物512可被布置在微-核MR单元506的周围以掩蔽在单元上发生的干涉。干涉屏蔽物512用作外部提供的“法拉第笼”,并可帮助克服因发送和接收的低功率射频信号所致的电磁干涉。在一个实施方案中,所述干涉屏蔽物512可以是将微-核MR单元封装于其中的盒子遮蔽物。例如,可配置干涉屏蔽物512以封装磁铁和微-核MR单元506的微-MR探测器。干涉屏蔽物512可以是金属屏蔽物例如铜屏蔽物、铝屏蔽物、Mu-金属屏蔽物、透磁合金屏蔽物和纳米-晶体颗粒结构铁磁金属屏蔽物。然而,可以预期的是,干涉屏蔽物512可以包括能够屏蔽不同类型的干涉的其它已知材料。例如,干涉屏蔽物512也促进避免使微-核MR单元506中的元件暴露于灰尘和其它外来颗粒。界面屏蔽物512可具有便于屏蔽微-核MR单元506的任何其它结构或配置。在一个实施方案中,干涉屏蔽物512可具有盒子形状的配置,例如其具有7.5 cm×7.5 cm×5 cm(长×宽×厚)的尺寸。

[0143] 随后,界面单元502处理分析数据并通过用户界面514显示处理的分析数据。界面单元502也可将处理的分析数据同分析数据的受试者映射。其后,可以将处理的分析数据传送至用于存储的数据存储系统516。当需要时,基于在移动设备504中接收的用户输入,存储数据可被用户检索。处理的分析数据可通过能够与数据存储系统516通信的任何其它计算装置而存取。可将处理的分析数据从移动装置504通信至计算装置518用于进一步的分析。处理的分析数据可存储于计算装置518的存储单元(未展示)中。计算装置518可位于的实验室中,其中可以进行更详细的分析。

[0144] 例如,用户可将微-核MR单元506用于在位置520中分析测试样本和纳米颗粒的至少一种混合物。混合物可以从其健康需要分析的受试者收集。可将与进行的分析相关的分析数据发送至用户的移动装置504。可将分析数据通过移动装置504和微-核MR单元506之间

的连接发送。该连接可以是Wi-Fi[®]或蓝牙[®]连接和因此可将移动装置504邻近微-核MR单元506放置。在移动装置504中的界面单元502可处理分析数据并将处理的分析数据显示给用户。处理的分析数据可通过提供的用户界面514显示。界面单元502将处理的分析数据与受试者的信息附加并实时地与在位置522中的数据存储系统516通信。受试者信息用作附加至处理的分析数据的元数据。因此,该元数据可包括,例如,患者的信息例如,但不限于个人细节、疾病类型、健康史和其它患者人口统计学细节。处理的分析数据可通过网络524例如广域网(WAN)、广域网(WLAN)、局域网(LAN)、无线都市域网(无线MAN)和蜂窝或移动网络而传送。处理的分析数据可随后基于通过界面单元502接收的用户输入而传送。用户输入可由用户通过用户界面514提交。在一个实施方案中,界面单元502也可允许用户从数据存储系统516检索处理的分析数据。

[0145] 也可将界面单元502配置以实时地将处理的分析数据发送至存在于位置528的计算装置526。数据的发送可响应于通过移动装置504接收用户指令而进行。计算装置526可对处理的分析数据进行详细的分析。在一个实施方案中,可将界面单元502配置以接收详细的分析并呈现给在位置520中的用户。因此界面单元502帮助用户方便地将处理的分析数据从位置520传送至定位遥远的位置522。按这种方式,分析数据的初步处理可以由用户使用移动装置504和微-核MR单元506在本地域进行,并随后传送至遥远的位置,其中处理的分析数据可以被存储或进一步在实验室中被分析。

[0146] 图9说明了在微-磁共振单元中管理分析数据的方法的流程图。当在微-核MR单元中分析针对一个或多个不同受试者的测试样本和纳米颗粒的混合物时生成分析数据。分析数据可被发送至与微-核MR单元可通信上连接的界面单元。在方框600中,界面单元接收分析数据。

[0147] 在方框602中,界面单元随后处理分析数据。分析数据可被处理并呈现或显示给用户。用户可以是例如医学专家、医生或分析员。例如,界面单元可以在用户装置中提供用户界面,通过所述用户界面可以显示处理的分析数据。在方框604中,处理的分析数据可以被通信至数据存储系统用于储存和检索。该数据存储系统可以遥远地定位于例如实验室。存储的处理的分析数据可基于通过在用户装置中的界面单元接受的用户输入而检索。用户输入可作为指令发送至数据存储系统。处理的分析数据可通过任何其它计算装置检索,所述其它计算装置可被配置以使用混合物的处理的分析数据进行更多分析。

[0148] 图10说明了依据本发明的一个实施方案在界面单元中处理分析数据的方法的流程图。在方框700中,从微-核MR单元接收的分析数据在界面单元中被处理以生成处理的分析数据。在方框702中,处理的分析数据被呈现或显示给用户。可实时处理数据。更具体而言,分析数据可以从微-核MR单元接收,和处理可在界面单元中进行并通过用户装置呈现或显示给用户。当进行至少一种流体样本的分析时,这允许用户方便地实时观察分析结果。可处理分析数据以允许分析数据以以下形式呈现:例如血液分布概况或在生物样本(例如血液)中各种生物靶(例如细胞、细菌或病原体)的存在/不存在或量。

[0149] 在方框704中,处理的分析数据可与和分析数据相关的受试者映射。样本可从受试者获得。进行映射以定义处理的分析数据和受试者之间的关系。当在微-核MR单元内接收到至少一种流体样本时,受试者的信息可通过界面单元接收。受试者的信息可包括例如个人细节、疾病类型、健康史和其它患者人口统计学细节。

[0150] 受试者的信息可通过界面单元接收。例如,受试者的信息可通过用户装置由在微-核MR单元中实施分析的技术员或实验室分析员输入。接收的受试者的信息可被附加于与受试者的至少一种样本相关的处理的分析数据。受试者的信息可自动地被附加。受试者的信息可基于用户输入而附加。在另一实施方案中,受试者的信息和处理的分析数据可分开存储。可在此情况下存在或存储映射表,其表明在处理的分析数据和受试者的信息之间的关系。可将处理的分析数据和受试者的信息加密。可使用本领域已知的任何技术进行加密。在一个实施方案中,可加密处理的分析数据和受试者的信息的一部分。可将处理的分析数据和受试者的信息存储在用户装置中用于未来的用途。

[0151] 图11说明了按照本发明的一个实施方案使用微-磁共振系统分析至少一种样本和纳米颗粒的混合物的方法的流程图。在方框800中,微-磁共振系统的微-核磁共振(MR)单元接收至少一种样本和纳米颗粒的混合物。该混合物在可被容纳于微-核MR单元的微-流体性导管内的容器中形成。在方框802中,随后通过微-核MR单元分析该混合物以检测至少一种靶物质(例如,细胞)。

[0152] 在方框804中,可将通过对混合物进行的分析而生成的分析数据通信至可通信上与微-核MR单元连接的界面单元。在方框806中,界面单元接收分析数据并随后处理分析数据。可处理分析数据,并随后将其呈现或显示给用户。用户可例如为医学专家、技术员或医生。例如,界面单元可提供在用户装置中的用户界面,通过该用户界面可显示处理的分析数据。在方框808中,可将处理的分析数据通信至用于存储和检索的数据存储系统。数据存储系统可遥远定位于例如实验室中。存储的处理的分析数据可基于通过在用户装置中的界面单元接收的用户输入检索。可将用户输入作为指令发送至数据存储系统。处理的分析数据可通过可通信上与数据存储系统连接的任何其它计算装置收集。可配置计算装置以使用处理的分析数据进行更多分析用于进行至少一种样本和纳米颗粒的混合物的详细的分析。

[0153] 关于图9、图10和图11描述的方法可使用处理器或任何其它处理装置进行。该方法步骤可使用存储在实体计算机可读介质上的编码的指令(例如,电脑可读指令)执行。实体计算机可读介质可以是例如闪速存储器、只读存储器(ROM)、随机存取存储器(RAM)或任何其它计算机可读存储介质或任何存储介质。尽管管理在微-核MR单元中生成的分析数据的方法参考图9、10和11的流程图解释,但可使用执行该方法的其它方法。例如,可改变各方法步骤的执行顺序,和/或可将一些描述的方法步骤改变、清除、分开或组合。此外,方法步骤可序贯地或同时地执行用于管理在微-核MR单元中生成的分析数据。

[0154] 本发明现将参考以下非限制性实施例描述。

实施例

[0155] 材料和方法

[0156] 羧基官能化超顺磁氧化铁(SPIO)纳米晶体和其缀合试剂盒从Ocean NanoTech LLC, USA获得。从Abcam, USA购买由蜡状芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)激起的兔多克隆抗体,其可与枯草芽孢杆菌(ab20556)交叉反应。从HiMedia Laboratories, Mumbai, India购买枯草芽孢杆菌亚种*spizizenii* (*B.subtilis*) (ATCC #6633)并按商家的方案保持。

[0157] SPIO-杆菌抗体的合成和表征

[0158] 通过遵循制造商的方案将与枯草芽孢杆菌反应的抗体缀合至羧基末端SPIO纳米

颗粒(尺寸 = 30 nm)。简而言之,1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺(EDC)/N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)的储备溶液按照制造商的说明书制备,产生终浓度2 mg/mL EDC和1 mg/mL NHS。将100 μ L的SPI0装入在Eppendorf管中的50 μ L的活化缓冲液中并向其中加入50 μ L EDC/NHS溶液。在持续混合下让混合物在室温(RT)反应10分钟。向活化SPI0纳米颗粒中加入250 μ L的偶合缓冲液,接着加入4 μ g的与枯草芽孢杆菌反应的抗体。允许混合物在持续混合下室温反应2小时。在两小时结束时,通过加入5 μ L的猝灭缓冲液停止该反应。通过使用100kDa分子量截止Amicon滤器过滤反应混合物将纳米缀合物与游离SPI0纳米颗粒分离并用储藏缓冲液(2 x 1 mL)洗涤。在此研究中使用的最终缀合物的尺寸通过动态光散射(Zsizer Nano-ZS, Malvern)测量并显示为45 nm的平均流体直径。使用Agilent 7500cx Inductively Coupled Plasma- Mass Spectrometry (ICP-MS)仪器测量纳米缀合物溶液的铁浓度为250 μ g/mL。

[0159] 用于细菌培养的培养基的制备

[0160] 将0.4 g的Difco™营养肉汤(Ref 234000, BD)转移至250 mL圆锥形烧瓶并将其溶解于50 mL的DM水中。将所得的溶液在121°C下高压灭菌15分钟。随后将含有培养基的冷却的烧瓶用于培养。

[0161] 枯草芽孢杆菌的培养

[0162] 将枯草芽孢杆菌原种培养物和营养肉汤溶液放置在37°C的保温箱中10-15分钟。随后将烧瓶转移至分层空气流通风橱。从原种中将500 μ L小心移液至50 mL的营养肉汤中,保持无菌条件。随后将烧瓶放置在Innova 4080保温箱-振荡器装置中在37°C在115 rpm下6小时。在6小时的孵育之后通过标准平板计数方法确定细菌的计数,并发现为 $\sim 10^8$ CFU/mL。

[0163] 连续稀释和样本制备

[0164] 对6小时的枯草芽孢杆菌培养物进行连续稀释以获得浓度为 10^7 、 10^5 和 10^3 个的细菌。

[0165] 将64 μ L的250 μ g/mL Fe的纳米缀合物溶液加入1 mL各自为 10^7 、 10^5 和 10^3 个的枯草芽孢杆菌样本中以在混合物中获得终浓度为16 μ g/mL的Fe。在混合之后即刻进行T2弛豫测量。

[0166] 弛豫测量计测量

[0167] 在40°C使用Bruker mq20 Minispec在0.5 T进行弛豫时间测量。按以下有规律的时间间隔获得数据:对于前9个时间点每1分钟,随后对于其后的6个时间点每5分钟,对于其后的6个时间点每10分钟,对于其后3个时间点每15分钟,和最终对于最后3个时间点每30分钟。对于T2弛豫时间测量,使用的脉冲序列是Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG)自旋回波。

[0168] CPMG脉冲序列:

[0169] $\{RD - 90_0 - \tau - [(180_{90} - \tau -)DE (180_{90} - \tau -) \text{asd} - \tau -]_N\}_{NS}$

[0170] 其中:

[0171] RD是循环延迟, τ 是延迟间隔,DE是在取样回波之前伪回波的数量,N是收集点的数量,NS是对信号平均的扫描的数量,和“asd”指示单数据点的获取。

[0172] 以下参数被用于实验:RD = 6 s; τ = 5 ms, DE = 0, N = 700, NS = 8。

[0173] 将来自自旋回波的数据拟合到下面给出的双指数等式:

[0174] $y = A1 * \exp -(x/\tau1) + A2 * \exp -(x/\tau2) + 0$

[0175] 其中：

[0176] A1, A2= 在时间零点的分量1和2的振幅

[0177] $\tau1, \tau2=$ 分量1和2的T2衰减常数

[0178] 0= 偏移量。

[0179] 结果

[0180] 在所有样本中,在将纳米缀合物加入不同浓度的枯草芽孢杆菌之后,观察到双指数T2。图1显示针对SPI0-纳米缀合物和不同浓度的细菌的混合物T2随时间的变化。在2h后获得的长T2与进行完全样本制备的实验中观察到的类似。因此将长T2分配为与细菌结合的纳米缀合物,并将短T2分配为未结合或游离在溶液中的纳米缀合物。此外,还观察到结合的纳米缀合物的长T2取决于细菌的浓度。因此,仅使用长T2而不需要过滤步骤以过滤未结合的纳米缀合物来定量在样本中的细菌数量是有可能的。

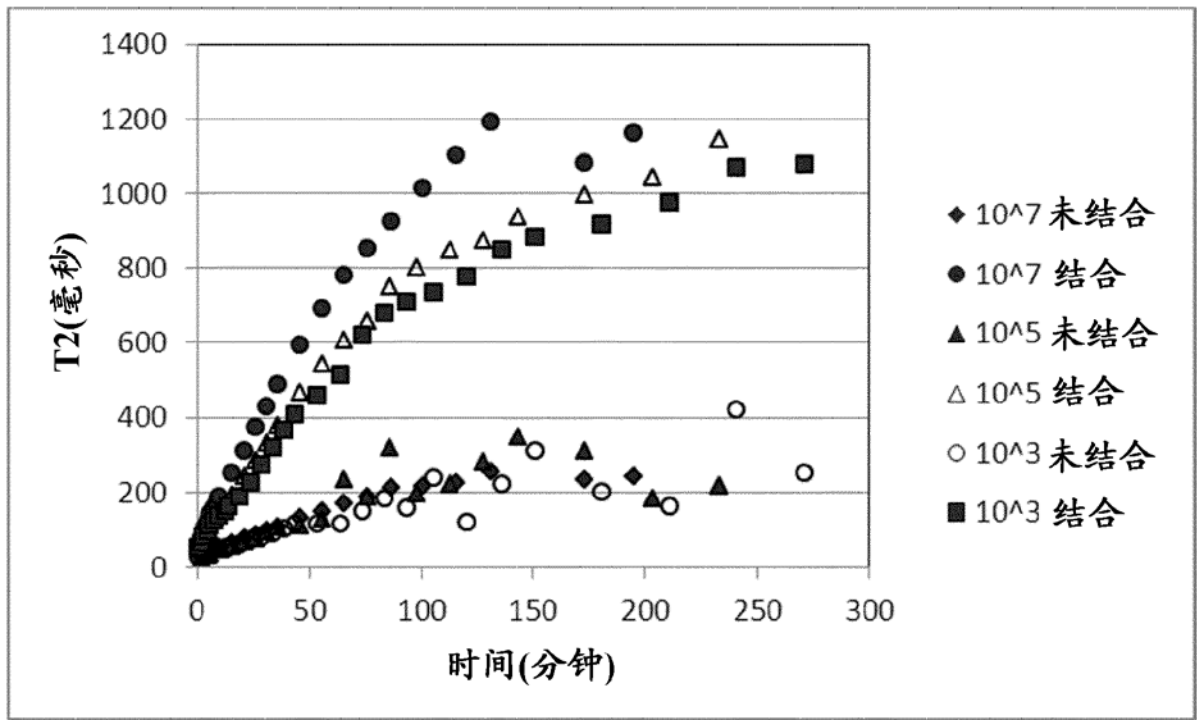


图 1

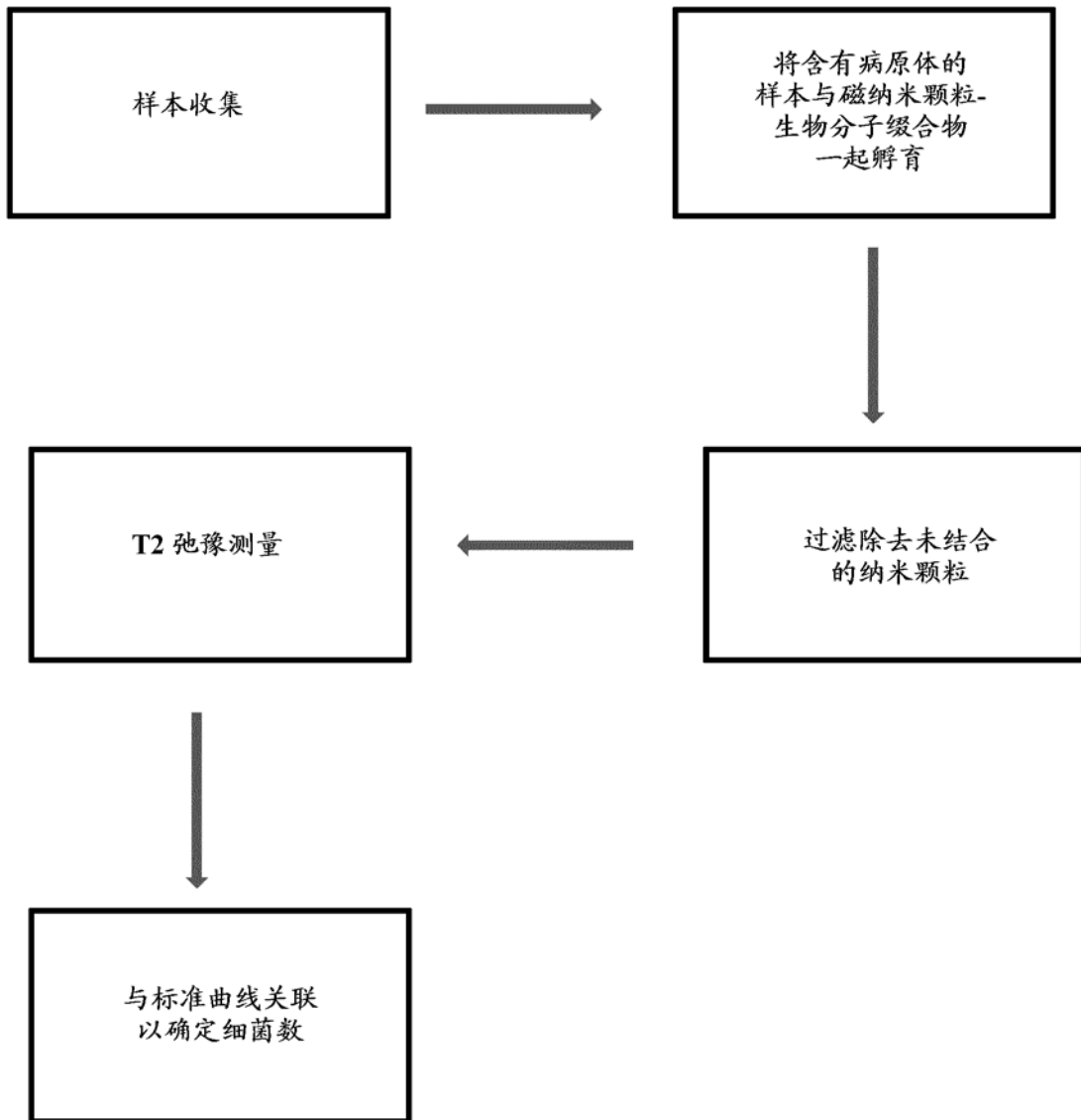


图 2

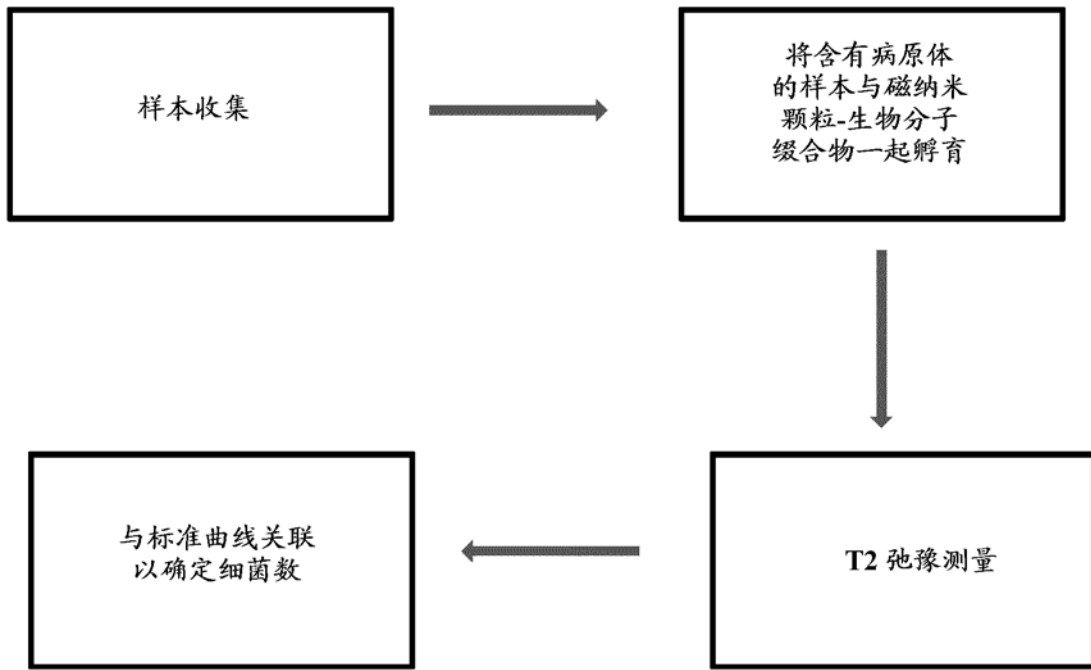


图 3

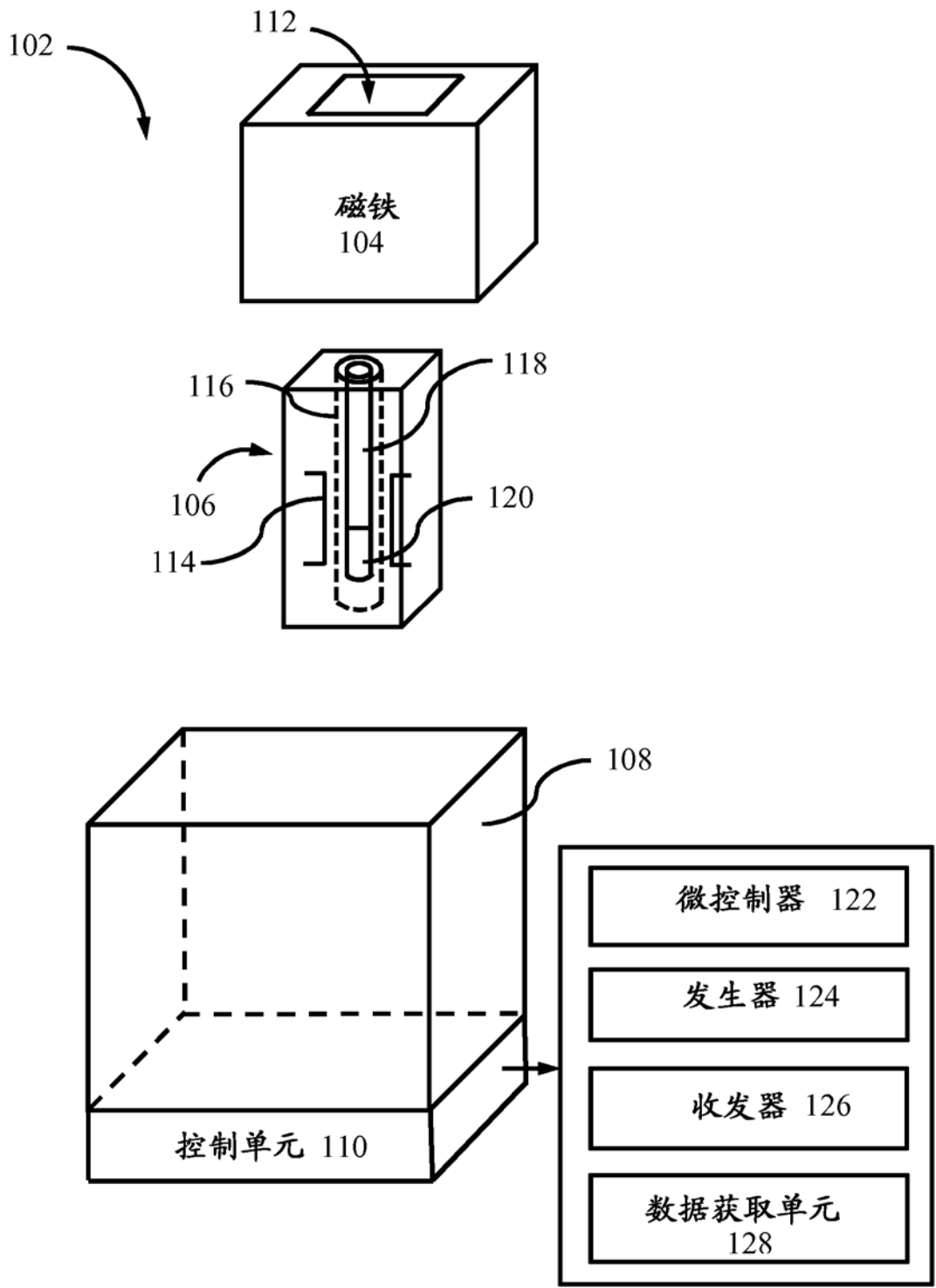


图 4

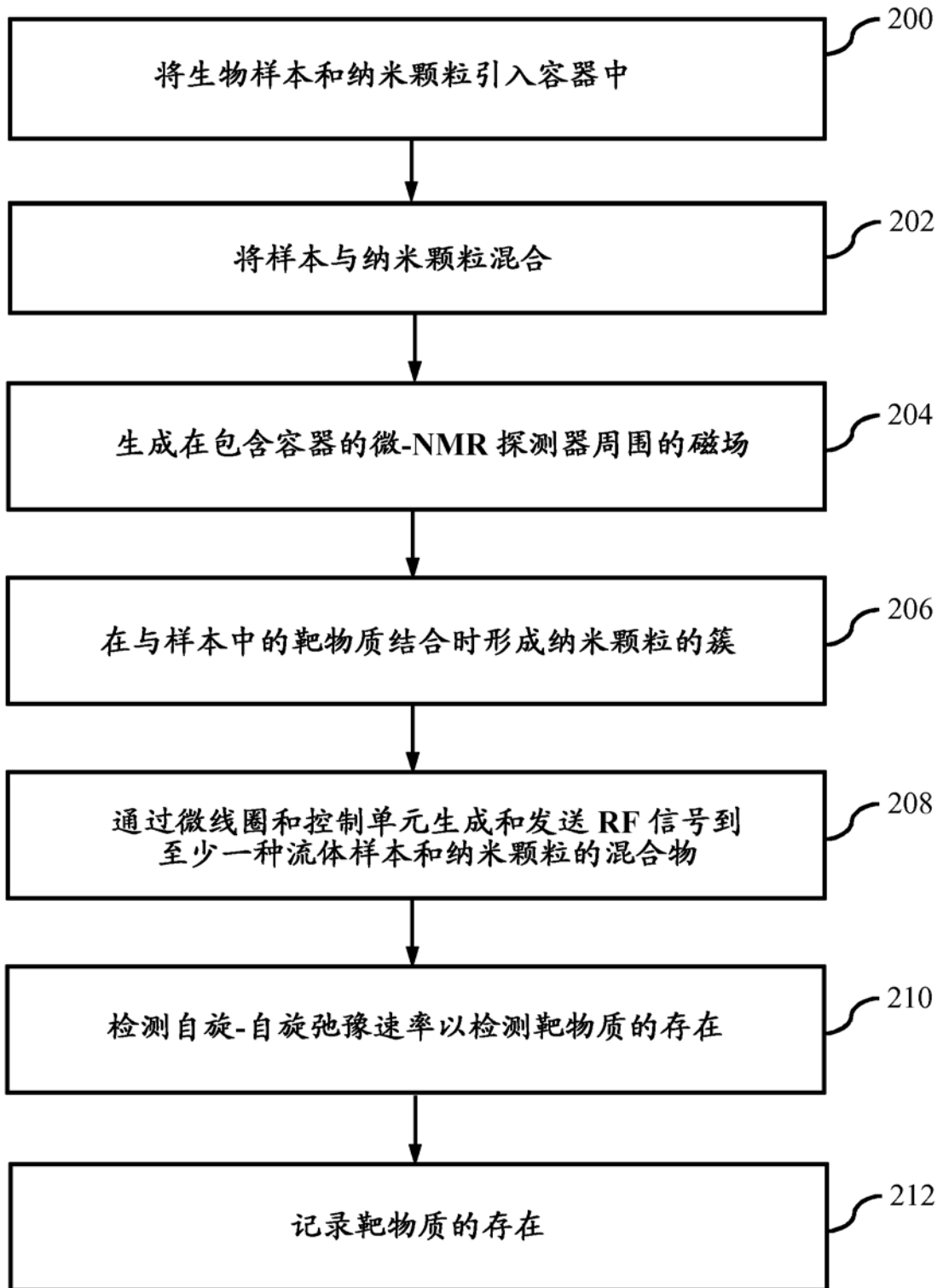


图 5

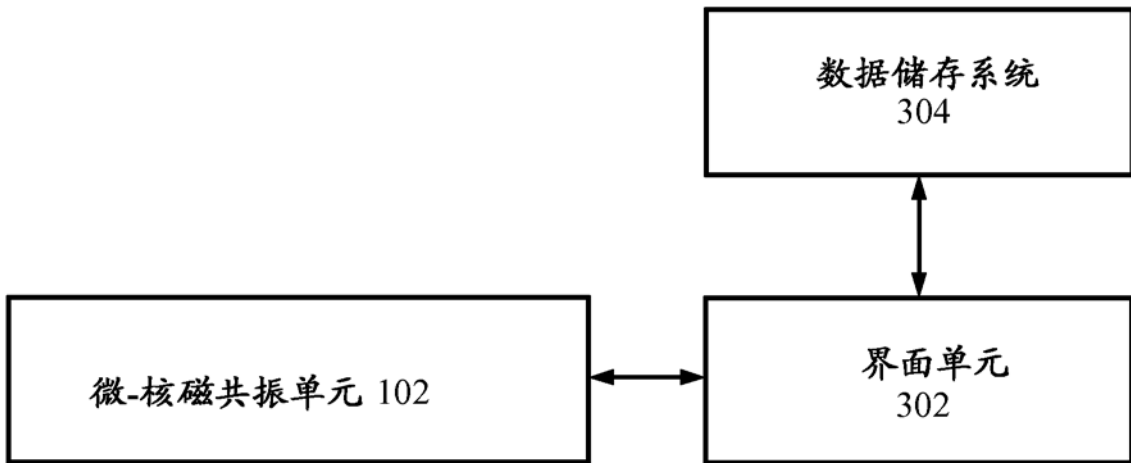


图 6



图 7

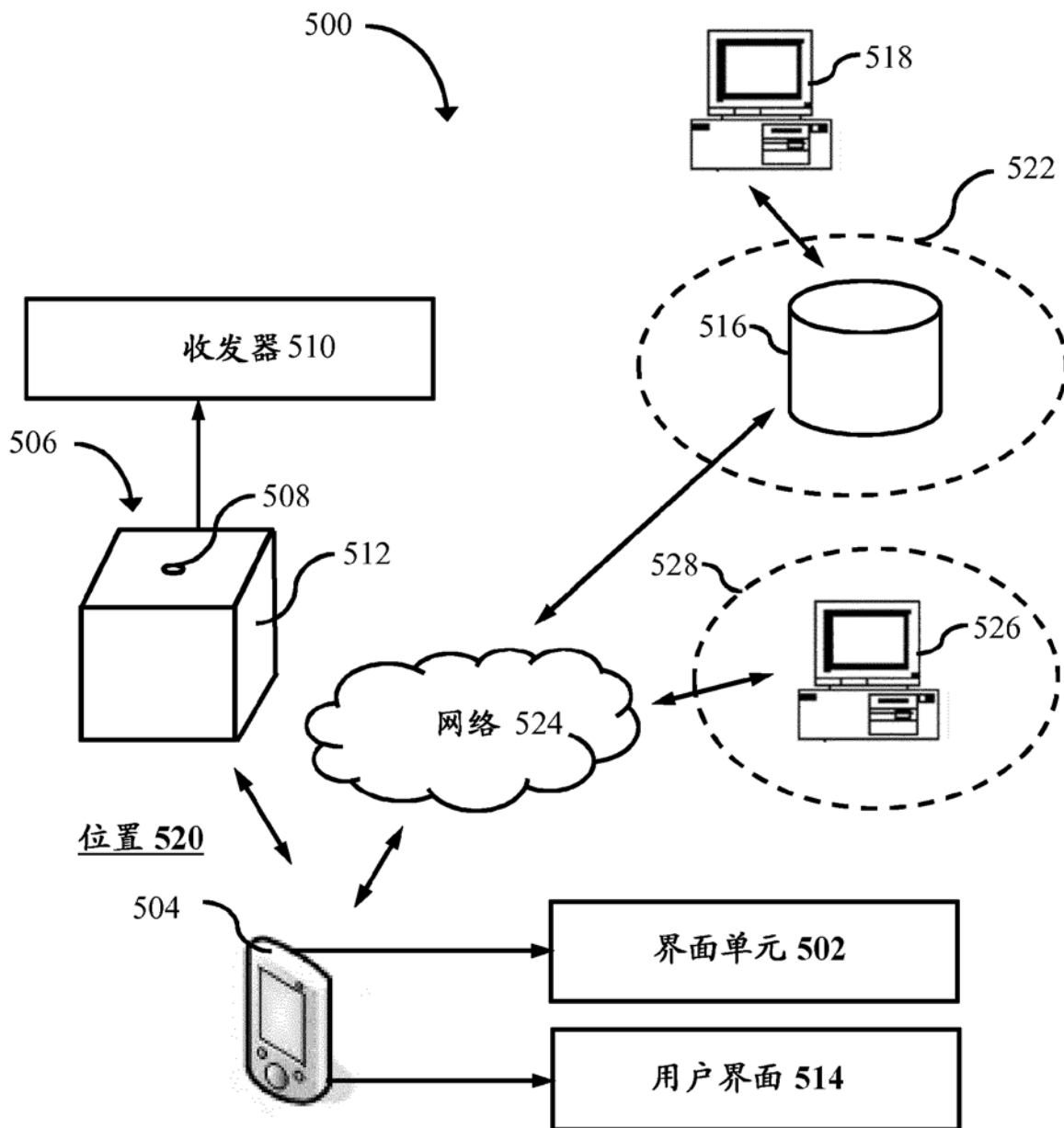


图 8

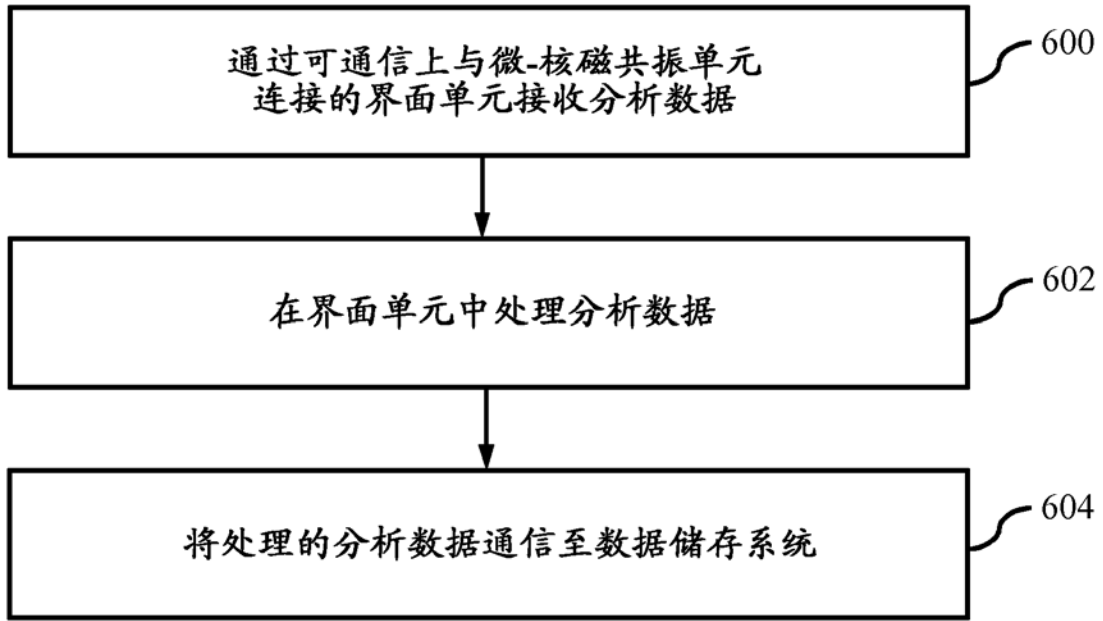


图 9

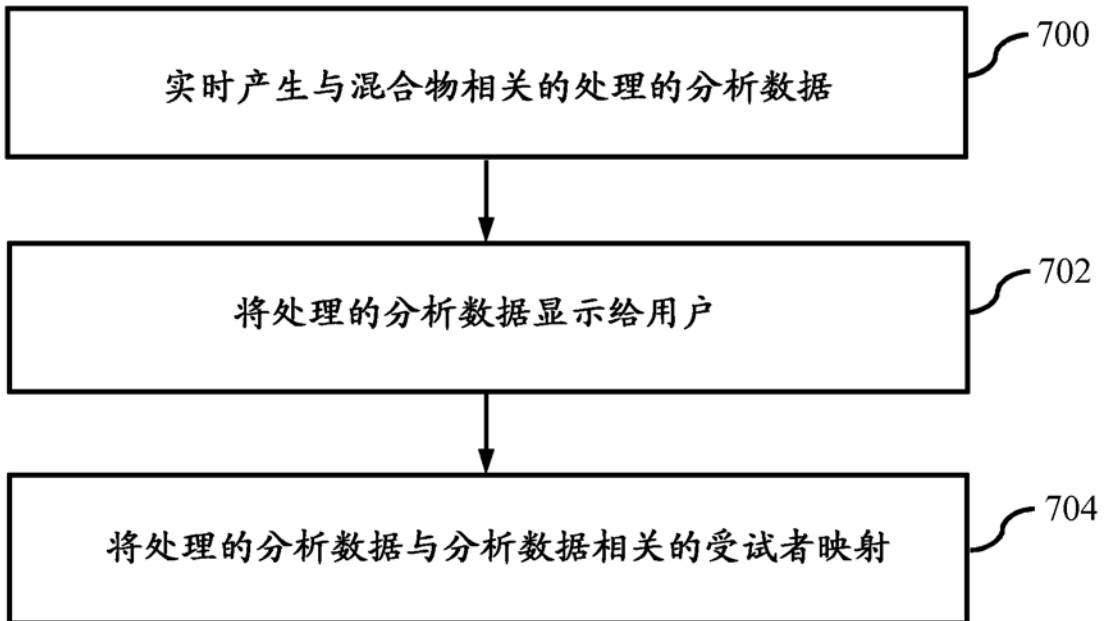


图 10

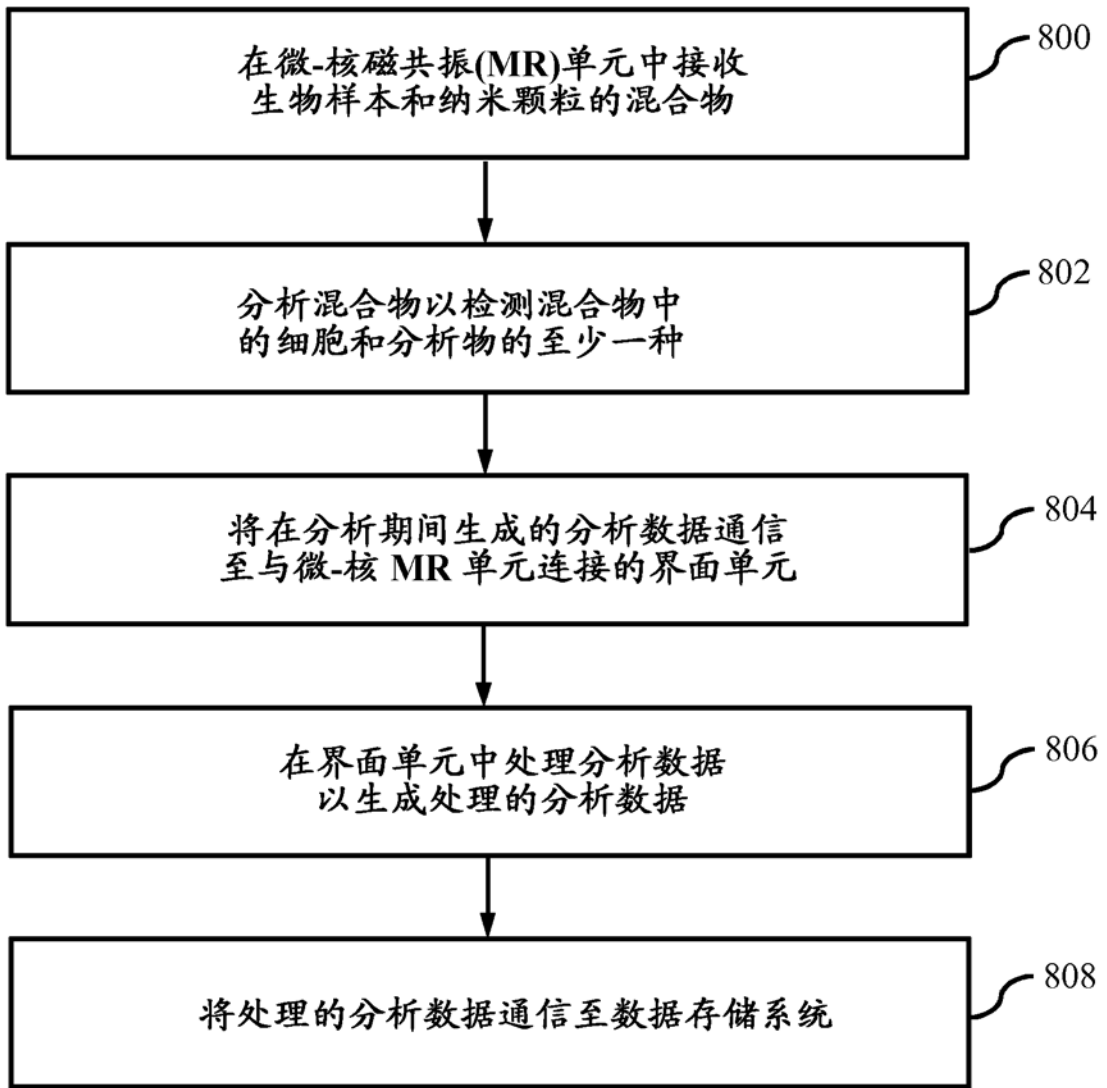


图 11