



(19) 中華民國智慧財產局

(12) 發明說明書公告本

(11) 證書號數：TW I567087 B

(45) 公告日：中華民國 106 (2017) 年 01 月 21 日

(21) 申請案號：104118842

(22) 申請日：中華民國 104 (2015) 年 06 月 11 日

(51) Int. Cl. : C07H21/04 (2006.01)

G01N21/64 (2006.01)

(71) 申請人：高雄醫學大學 (中華民國) KAOHSIUNG MEDICAL UNIVERSITY (TW)

高雄市三民區十全一路 100 號

(72) 發明人：吳秀梅 WU, SHOU MEI (TW) ; 陳俊安 CHEN, CHUNG AN (TW)

(74) 代理人：林文杰

(56) 參考文獻：

JP 2007-228803A

Zhihe Qing et al. dsDNA-specific fluorescent copper nanoparticles as a "green" nano-dye for polymerization-mediated biochemical analysis. Chem. Commun., 2014, 50, 12746-12748.

Rong Hu et al. Double-strand DNA-templated formation of copper nanoparticles as fluorescent probe for label free nuclease enzyme detection. Biosens Bioelectron. 2013 Apr 15;42:31-5.

審查人員：陳逸霖

申請專利範圍項數：6 項 圖式數：9 共 26 頁

(54) 名稱

用於偵測樣本中目標 DNA 的寡核苷酸及方法

OLIGONUCLEOTIDE AND METHOD FOR DETECTING TARGET DNA IN A SAMPLE

(57) 摘要

本發明提供一寡核苷酸，其包含一由 SEQ ID NO：1 所組成的核苷酸序列。本發明亦提供以該寡核苷酸用於一樣本中偵測目標 DNA 的方法。

The invention provides an oligonucleotide comprising a nucleotide sequence consisting of SEQ ID NO: 1. The invention also provides method for detecting target DNA in a sample with the oligonucleotide.

指定代表圖：

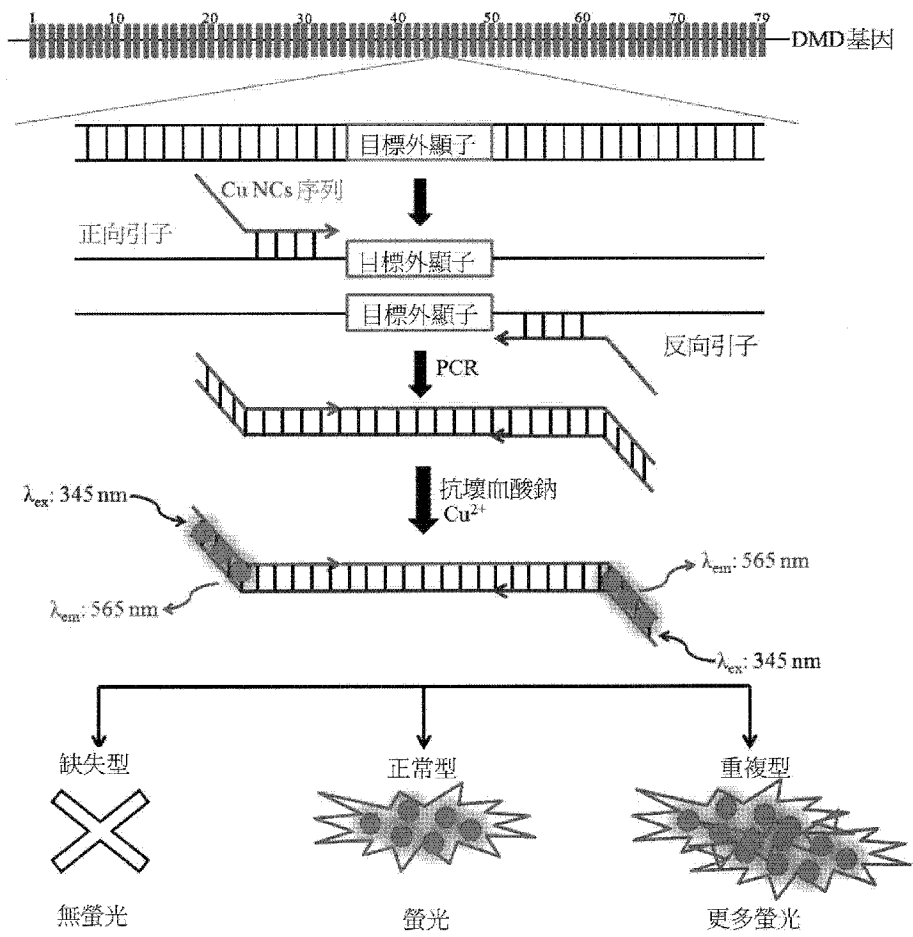


圖 1

公告本**發明摘要**

※ 申請案號：(04118842)

C07H 21/04 (2006.01)

※ 申請日：104.6.11

※IPC 分類：G01N 21/64 (2006.01)

【發明名稱】(中文/英文)

用於偵測樣本中目標 DNA 的寡核苷酸及方法 / OLIGONUCLEOTIDE AND METHOD FOR DETECTING TARGET DNA IN A SAMPLE

【中文】

本發明提供一寡核苷酸，其包含一由 SEQ ID NO: 1 所組成的核苷酸序列。本發明亦提供以該寡核苷酸用於一樣本中偵測目標 DNA 的方法。

【英文】

The invention provides an oligonucleotide comprising a nucleotide sequence consisting of SEQ ID NO: 1. The invention also provides method for detecting target DNA in a sample with the oligonucleotide.

【代表圖】

【本案指定代表圖】：第（ 1 ）圖。

【本代表圖之符號簡單說明】：

無。

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

【發明名稱】(中文/英文)

用於偵測樣本中目標 DNA 的寡核苷酸及方法 / OLIGONUCLEOTIDE AND METHOD FOR DETECTING TARGET DNA IN A SAMPLE

【技術領域】

【0001】 本發明係關於一寡核苷酸及用於一樣本中偵測目標 DNA 的方法。

【先前技術】

【0002】 近來有一些貴金屬奈米粒子使用 DNA 作為螢光金屬奈米粒子 (nanoparticles, NPs) 或奈米團簇 (nanoclusters, NCs)，是透過金屬離子結合於 DNA 上及後續 DNA 複合金屬離子的化學還原形成。因此，以 DNA 為模板的螢光金屬 NPs 或 NCs 作為生物化學應用的螢光探針具有極大的潛力，因為其超微細尺寸、低毒性、良好生物相容性、傑出的光物理性質的優點，以及靈活整合以核酸為基礎的目標辨識能力與訊號放大機制。

【0003】 相較於其他現有螢光金屬 NPs，以 DNA 為模板的銅 NPs (CuNPs)，包括分別由 Mokhir et al. 與 Wang et al. 發表的以隨機雙股 DNA 為模板的 CuNPs (double-stranded DNA-templated CuNPs, dsDNA-CuNPs) 與以聚(胸腺嘧啶)為模板的 CuNPs (poly T-CuNPs)。其形成可源自 Cu^0 在 DNA 骨架上的高親和力聚集，係透過溶液中的 Cu^{2+} 及還原劑之間的化學反應所形成。此外，CuNPs 的合成是高效率、簡便且快速 (在室溫下約 5 分鐘)，因此奠定了其在生物感測廣泛應用的基礎。

【0004】 本發明提供一寡核苷酸，其包含一由 SEQ ID NO: 1 所組成的核苷酸序列。

【0005】 本發明提供一用於一樣本中偵測目標 DNA 的方法，其包含提供一第一引子，其具有一與該目標 DNA 的一第一部份互補並可與其雜合的 3'端及一包含一由 SEQ ID NO: 1 所組成的核苷酸序列的 5'端；及一第二引子，其具有一與該目標 DNA 的一第二部份互補並可與其雜合的 3'端及一包含該由 SEQ ID NO: 1 所組成的核苷酸序列的 5'端；利用該第一引子與該第二引子 PCR 擴增該目標 DNA；將一包含銅離子的溶液及一還原試劑加入該 PCR 擴增的一產物以與該由 SEQ ID NO: 1 所組成的核苷酸序列形成一奈米銅粒子，其造成螢光放射；及偵測該螢光放射。

【發明內容】

【0006】 本發明建立一靈敏、專一性且易於辨別目標 DNA 的生物感測方法。

【0007】 本發明提供一寡核苷酸，其包含一由 SEQ ID NO: 1 所組成的核苷酸序列。該寡核苷酸進一步與銅離子形成一奈米銅粒子並發出螢光。

【0008】 本發明提供一用於一樣本中偵測目標 DNA 的方法，其包含提供一第一引子，其具有一與該目標 DNA 的一第一部份互補並可與其雜合的 3'端及一包含一由 SEQ ID NO: 1 所組成的核苷酸序列的 5'端；及一第二引子，其具有一與該目標 DNA 的一第二部份互補並可與其雜合的 3'端及一包含該由 SEQ ID NO: 1 所組成的核苷酸序列的 5'端；利用該第一引子與該第二引子 PCR 擴增該目標 DNA；將一包含銅離子的溶液及一還原試劑加入

該 PCR 擴增的一產物以與該由 SEQ ID NO: 1 所組成的核苷酸序列形成一奈米銅粒子，造成螢光放射；及偵測該螢光放射。

【0009】 在一實施例中，該包含銅離子的溶液為 CuSO_4 溶液。

【0010】 在另一實施例中，該還原試劑為抗壞血酸鈉。

【0011】 在另一實施例中，該目標 DNA 為一目標基因之一外顯子。

【0012】 在另一實施例中，該目標基因係針對裘馨氏肌肉萎縮症 (Duchenne muscular dystrophy, DMD)。

● 【圖式簡單說明】

【0013】 圖 1 顯示依據 dsDNA-CuNCs 用於分析 PCR 反應之基因型的感測步驟之示意圖。

【0014】 圖 2(A)所得的 dsDNA-CuNCs 的螢光激發(藍線)與發射(紅線)光譜；(B) 在不同條件下該感測系統的螢光光譜：(a) 正常外顯子 46 (PCR 之後)；(b) 空白外顯子 46 (PCR 之後)；(c) 外顯子 46 正向引子；(d) 外顯子 46 反向引子；(e) 10 mM MOPS + 150 mM NaCl；(f) 10 mM MOPS + 150 mM NaCl (未與銅離子及抗壞血酸鈉反應)； Cu^{2+} 濃度：500 μM ；抗壞血酸鈉濃度：4 mM。

【0015】 圖 3 顯示真實 DNA 樣本所得的 dsDNA-CuNCs 之穿透式電子顯微鏡 (TEM) 圖：(A) 無 DNA，(B) 正常型 (normal type)，(C) 缺失型 (deletion type)，(D) 重複型 (duplication type)。

【0016】 圖 4 顯示引子的濃度對 PCR 反應中 dsDNA-CuNCs 的螢光的影響。(A) 120 nM 之正向與反向引子；(B) 160 nM 之正向與反向引子；(C)

200 nM 之正向與反向引子。(a) 重複型 (Duplication type) ; (b) 正常型 (Normal type) ; (c) 缺失型 (Deletion type) ; (d) 空白組。其他條件與圖 2 相同。

【0017】 圖 5 顯示 PCR 的循環數對 dsDNA-CuNCs 的螢光的影響。(A) 30 循環 ; (B) 35 循環 ; (C) 40 循環。(a) 重複型 (Duplication type) (b) 正常型 (Normal type) ; (c) 缺失型 (Deletion type) ; (d) 空白組。其他條件與圖 2 相同。

【0018】 圖 6 顯示 Cu^{2+} 濃度對 dsDNA-CuNCs 的螢光的影響。(A) 250 μM ; (B) 500 μM ; (C) 1000 μM 。(a) 重複型 (Duplication type) (b) 正常型 (Normal type) ; (c) 缺失型 (Deletion type) ; (d) 空白組。其他條件與圖 2 相同。

【0019】 圖 7 顯示抗壞血酸濃度對 dsDNA-CuNCs 的螢光的影響。(A) 2 mM ; (B) 4 mM ; (C) 6 mM。(a) 重複型 (Duplication type) (b) 正常型 (Normal type) ; (c) 缺失型 (Deletion type) ; (d) 空白組。其他條件與圖 2 相同。

【0020】 圖 8 顯示在 $\lambda_{\text{em}} = 565 \text{ nm}$ ($\lambda_{\text{ex}} = 345 \text{ nm}$) 下探討 CuNCs 穩定性隨反應時間的變化。

【0021】 圖 9 顯示臨床試驗中不同 DMD 外顯子的 dsDNA-CuNCs 檢測的效果。(A) 外顯子 45 ; (B) 外顯子 47。(a) 重複型 (Duplication type) (b) 正常型 (Normal type) ; (c) 缺失型 (Deletion type) ; (d) 空白組。其他條件與圖 2 相同。

【實施方式】

【0022】 材料

【0023】 一種包含一由 SEQ ID NO: 1 所組成的核苷酸序列的寡核苷酸係嵌入用於目標基因 (DMD) 外顯子之引子的 5'端。所得到的寡核苷酸序列為 SEQ ID NO: 2 至 SEQ ID NO: 7。所有寡核苷酸係購自 MD Bio, Inc (台北, 台灣), 並以溶於無菌 H₂O 之 100 μM 原液 (stock solution) 儲存在 -20°C。3-嗎啉基丙-1-磺酸 (3-morpholinopropane-1-sulfonic acid, MOPS)、3-(N-嗎啉基)丙磺酸鈉鹽 (3-(N-Morpholino) propanesulfonic acid sodium salt, MOPS sodium salt)、(+)-L-抗壞血酸鈉 (Sodium L-ascorbate) 及 CuSO₄ 係購自 SigmaAldrich (Sigma, St. Louis, MO, USA)。氯化鈉 (NaCl)、鹽酸 (HCl)、氫氧化鈉 (NaOH) 係來自 E. Merck (Darmstadt, Germany)。二次蒸餾水係取自 Milli-Q 純水系統 (Millipore, Milford, MA, USA)。

【0024】 PCR 的檢測步驟及感測器製備

【0025】 PCR 最終體積為 50 μL, 包含 50 ng 之基因體 DNA、2.5 mM dNTP (TaKaRa, Shiga, Japan)、1× PCR 緩衝液 (TaKaRa)、每一引子 160 nM 及 2.0 U 之 e2TAK DNA 聚合酶 (TaKaRa) 的混合物。PCR 擴增係於 Tprofessional Thermocycler (Biometra, Göttingen, Germany) 中執行, 初始變性 (denaturation) 步驟在 95°C 進行 10 分鐘, 接著已下步驟進行 35 個循環: 在 95°C 變性 30 秒、在 59°C 降溫 (annealing) 15 秒、在 72°C 延展 (extension) 30 秒及在 72°C 進行 10 分鐘的最終延展步驟。在 PCR 循環完成後, 將產物與含有 150 mM NaCl 之 10 mM MOPS 緩衝液混合, 然後將 4 mM 抗壞血酸鈉及 500 μM CuSO₄ 加入該溶液以得到最終 200 μL 之體積, 並使其在室溫反應 3 分鐘。

【0026】 設備

【0027】 螢光測量係於 F-4500 螢光光譜儀 (Hitachi, Japan) 執行，分別將激發及發射狹縫設定為 5.0 nm 及 20 nm。掃描速度設定為 240 nm/min。使用具有光學路徑長度 1.0 cm 之石英螢光槽。除非另有說明，所有測量係在室溫下執行。該系統的螢光發射係從 500 至 650 nm 紀錄在 345 nm 的激發波長。穿透式電子顯微鏡法 (TEM) 測量係於 JEOL JEM-1400 穿透式電子顯微鏡 (JEOL, Japan) 上進行，在 100 kV 操作。TEM 樣本係於碳塗覆的銅柵基質 (carbon-coated copper grid substrates) 上製備，然後在室溫下於烘箱中烘烤。

【0028】 真實樣本應用

【0029】 來自 DMD 患者及正常個體的 DNA 樣本係由高雄醫學大學附設中和紀念醫院取得。根據標準作業程序，利用基因體 DNA 純化套組 (ZYMO RESEARCH, Quick-gDNA MiniPrep-D3024, USA) 自末梢全血 (peripheral whole blood) 採集基因體 DNA。本研究已取得高雄醫學大學附設醫院人體試驗審查委員會核准，並招募參與者及執行人體試驗。已從所有參與者取得知情同意書。

【0030】 結果**【0031】 用於 DMD 之外顯子偵測的生物感測器之設計及原理**

【0032】 本研究的原理如圖 1 所示。設計可形成 dsDNA 及螢光 CuNCs 的引子序列。根據該作用機制，使用正常型基因體 DNA 之成功的 PCR 反應，其 PCR 產物可在室溫並於目前緩衝液條件下形成一穩定的雙鏈 (duplex)，可作為以抗壞血酸鈉還原 Cu^{2+} 所反應形成 CuNCs 的模板。因

此，該形成的 dsDNA-CuNCs 複合物將產生可被偵測的高強度螢光。另一方面，當使用缺失型基因體 DNA 時，無法形成 dsDNA-CuNCs，因而該 PCR 反應無法成功產生螢光而無法被偵測。然而，使用重複型基因體 DNA，螢光會比正常型基因體 DNA 的強度更高。基於此概念，可更輕易地辨別該外顯子為缺失型或重複型。

【0033】 該 dsDNA 為模板的 CuNCs 係根據先前的報告來合成。所得到的螢光 CuNCs 分別在 345 與 565 nm 有激發和發射波峰（圖 2A）。因此，需證實形成 dsDNA 對於螢光的產生是必要的，而在不同條件下測試該感測系統的螢光光譜。由結果可觀察到，成功的 PCR 反應中會形成 CuNCs 而產生螢光訊號。在其他條件中，即使該引子存在於 PCR 反應中且緩衝液中有銅離子與抗壞血酸也不會產生螢光。另一方面，亦可確認背景值在反應中不會產生任何干擾，其改善的 S/N 比值以進行訊號區別（圖 2B）。可表示 CuNCs 不會在 dsDNA 或 ssDNA 模板存在下形成，提供用於 dsDNA-CuNCs 區分 dsDNA 與 ssDNA 良好的選擇性，並有助於在 DMD 診斷中辨別出缺失或重複的基因型。

【0034】 該 CuNCs 係以穿透式電子顯微鏡（TEM）觀察，可測定及鑑定 CuNCs，並可支持在低濃度 CuSO_4 下形成奈米粒子。在沒有真實 DNA 樣本時可觀察到，該 dsDNA-CuNCs 形成主要約小於 10 nm 的粒子大小。由此結果，CuNCs 之燒結顯著呈現於圖 3 中。圖 3(A) 無 DNA 樣本與銅離子及抗壞血酸鈉反應，可觀察到很少 CuNCs 產生。對於缺失型而言，可觀察到一些 CuNCs 燒結的情形，但不明顯，只形成一些 CuNCs（圖 3C）。

【0035】 圖 3(B)至 3(D) 為 PCR 反應後正常、缺失及重複型的 DNA

樣本，並以螢光分光光度計（fluorescent spectrophotometer）測量。因此，可清楚觀察到圖 3(B)中 CuNCs 的粒徑大小，及圖 3(D)中重複型樣本明顯的燒結情形。基於上述結果，螢光與 CuNCs 形成的量有對應關係。因此，可證實本研究的機制，且在正常、缺失及重複型的真實 DNA 樣本中呈現不同的螢光強度（圖 3）。

【0036】 PCR 反應最佳化

【0037】 在本發明中，PCR 反應在 CuNCs 序列的量扮演重要角色。已有報告指出 dsDNA 可作為有效的模板，且形成的 CuNCs 具有良好的螢光，而 ssDNA 則不支持奈米粒子形成。在本實驗中，PCR 反應成功產生互補的 PCR 引子，以形成 dsDNA 並產生螢光 CuNCs。由於這個原因，我們將引子的濃度和 PCR 反應循環數最佳化。圖 4 顯示本研究引子濃度的結果。根據 PCR 原理，成功的反應需要適當的引子濃度。當加入不足的引子時，PCR 的產物會形成 CuNCs 並產生弱螢光，如圖 4(A)所示。因此，我們使用 160 nM 之引子並得到一最佳化結果於圖 4 (B)。圖 4 (C)證實當使用太多引子時，空白組也會有一些螢光，因為產生一些非專一性的 PCR 產物。最終，在 PCR 反應使用 160 nM 的引子濃度。

【0038】 PCR 循環的次數對於會影響 PCR 產物的產率的因子有影響。我們分別測試了 30、35 及 40 個循環。結果顯示 30 個循環產生不足量的螢光強度。在 40 個循環中，空白組會顯示部份螢光訊號。因此，選擇 35 個循環作為最佳化的條件（圖 5）。

【0039】 Cu^{2+} 離子濃度最佳化

【0040】 Cu^{2+} 離子的效果是影響 PCR 產物中 dsDNA-CuNCs 螢光的

重要因子。Morkhir et al.指出 dsDNA-CuNCs 可由以下步驟形成：二價銅 (copper (II)) 反應還原成一價銅 (copper (I))，接著一價銅 (copper (I)) 經歧化反應成爲二價銅 (copper (II)) 及零價銅 (copper (0))，後者會聚集在 dsDNA 上產生穩定的奈米粒子。根據該結果，圖 6 (A)顯示使用 250 μM Cu^{2+} 時得到弱螢光，且在 500 μM 及 1000 μM Cu^{2+} 離子之間無顯著差異。然而，先前報告指出二價銅複合物會透過在與還原劑反應後的氧系自由基 (oxygen-based radicals) 切斷 DNA。當 Cu^{2+} 濃度高於 500 μM ， Cu^{2+} /抗壞血酸鈉混合物會產生羥基自由基 (hydroxyl radical)，造成雙股 DNA 螺旋的破壞。因此，在所有後續實驗中選擇濃度 500 μM 的 Cu^{2+} 。

【0041】 抗壞血酸濃度最佳化

【0042】 由於高濃度的 Cu^{2+} /抗壞血酸混合物會產生羥基自由基並導致 dsDNA 模板的降解。另探討抗壞血酸鈉的濃度。結果顯示於圖 7，觀察到在抗壞血酸濃度爲 4 mM 時可達到最高的螢光訊號。然而，當抗壞血酸濃度高於 4 mM，螢光強度會隨著抗壞血酸濃度增加而減低。因此，本發明使用 4 mM 抗壞血酸。

【0043】 反應時間的影響與 dsDNA-CuNCs 的表現

【0044】 爲了加速使用 dsDNA-CuNCs 作爲螢光探針的 PCR 產物之偵測，探討了 dsDNA 與 CuNCs 之間的反應時間對偵測正常型外顯子的影響 (圖 8)。螢光強度在 3 分鐘後達到最大峰值，之後開始減少。因此，本研究選擇 3 分鐘之反應時間。爲了辨別 DMD 之正常或重複型，於上述圖中可觀察到，重複型的螢光強度較正常型的高出 600 RFU。這些結果證實使用 dsDNA-CuNCs 方法測定 DMD 之缺失型或重複型提供一個診斷螢光訊號

的模式簡易方法。

【0045】 其他外顯子的應用與真實樣本的診斷

【0046】 爲了闡明該策略是否可應用至其他外顯子的偵測，亦測試外顯子 45 與 47（圖 9）。6 個臨床樣本係來自醫院，所有樣本與 MLPA 方法有相同的結果。結果分別包含來自外顯子 45 至 47 的 5 個缺失型與 1 個重複型（表 1）。此結果指出該方法具有 DMD 診斷的潛力。

【0047】 表 1、以 MLPA 及 dsDNA-CuNCs 方法檢測 DMD 的基因型的結果差異

對象 (患者編號)	MLPA	dsDNA-CuNCs
1	del 外顯子 45-47	del 外顯子 45-47
2	del 外顯子 45-47	del 外顯子 45-47
3	del 外顯子 45-47	del 外顯子 45-47
4	del 外顯子 45-47	del 外顯子 45-47
5	del 外顯子 45-47	del 外顯子 45-47
6	dup 外顯子 45-47	dup 外顯子 45-47

del = 缺失；dup = 重複

【序列表】

<110> 高雄醫學大學

<120> 用於偵測樣本中目標 DNA 的寡核苷酸及方法 / OLIGONUCLEOTIDE AND METHOD FOR DETECTING TARGET DNA IN A SAMPLE

<130> 2416-KMU-TW

<160> 7

● <170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 23

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 用於形成 CuNC 的合成 DNA

● <220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(23)

<400> 1

ttaccttctt ccgcaatact gca

23

<210> 2

<211> 44

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引子

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(44)

<400> 2

ttaccttcct ccgcaatact gcaagacatg gggcttcatt ttg

44

<210> 3

<211> 43

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引子

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(43)

<400> 3

ttaccttcct ccgcaatact gcatgtagt gcctttcacc ctg

43

<210> 4

<211> 43

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引子

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(43)

<400> 4

ttaccttctt cgcgaatact gcattgccat gtttgtgtcc cag

43



<210> 5

<211> 44

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引子

<220>

<221> misc_feature



<222> (1)..(44)

<400> 5

ttaccttctt cgcgaatact gcatgggcag aaaaccaatg attg

44

<210> 6

<211> 45

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引子

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(45)

<400> 6

ttaccttct cgcgaatact gcaagacaag gtagttggaa ttgtg

45

<210> 7

<211> 43

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引子

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(43)

<400> 7

ttaccttct cgcgaatact gcaacatgtg acggaagaga tgg

43

申請專利範圍

1. 一種寡核苷酸，其包含一由 SEQ ID NO: 1 所組成的核苷酸序列。
2. 如申請專利範圍第 1 項所述之寡核苷酸，其中該寡核苷酸形成雙股寡核苷酸後，該雙股寡核苷酸可進一步與銅離子形成一奈米銅粒子並發出螢光。
3. 一種用於一樣本中偵測目標 DNA 的方法，其包含：
提供一正向引子，其具有一與該目標 DNA 的一第一部份互補的 3'端及一包含一由 SEQ ID NO: 1 所組成的核苷酸序列的 5'端；及一反向引子，其具有一與該目標 DNA 的一第二部份互補的 3'端及一包含該由 SEQ ID NO: 1 所組成的核苷酸序列的 5'端；
利用該正向引子與該反向引子 PCR 擴增該目標 DNA；
將一包含銅離子的溶液及一還原試劑加入該 PCR 擴增的一產物以與該由 SEQ ID NO: 1 所組成的核苷酸序列形成一奈米銅粒子，其造成螢光放射；及
偵測該螢光放射。
4. 如申請專利範圍第 3 項所述之方法，其中該包含銅離子的溶液為 CuSO_4 溶液。
5. 如申請專利範圍第 3 項所述之方法，其中該還原試劑為抗壞血酸鈉。
6. 如申請專利範圍第 3 項所述之方法，其中該目標 DNA 為一目標基因之一外顯子。

圖式

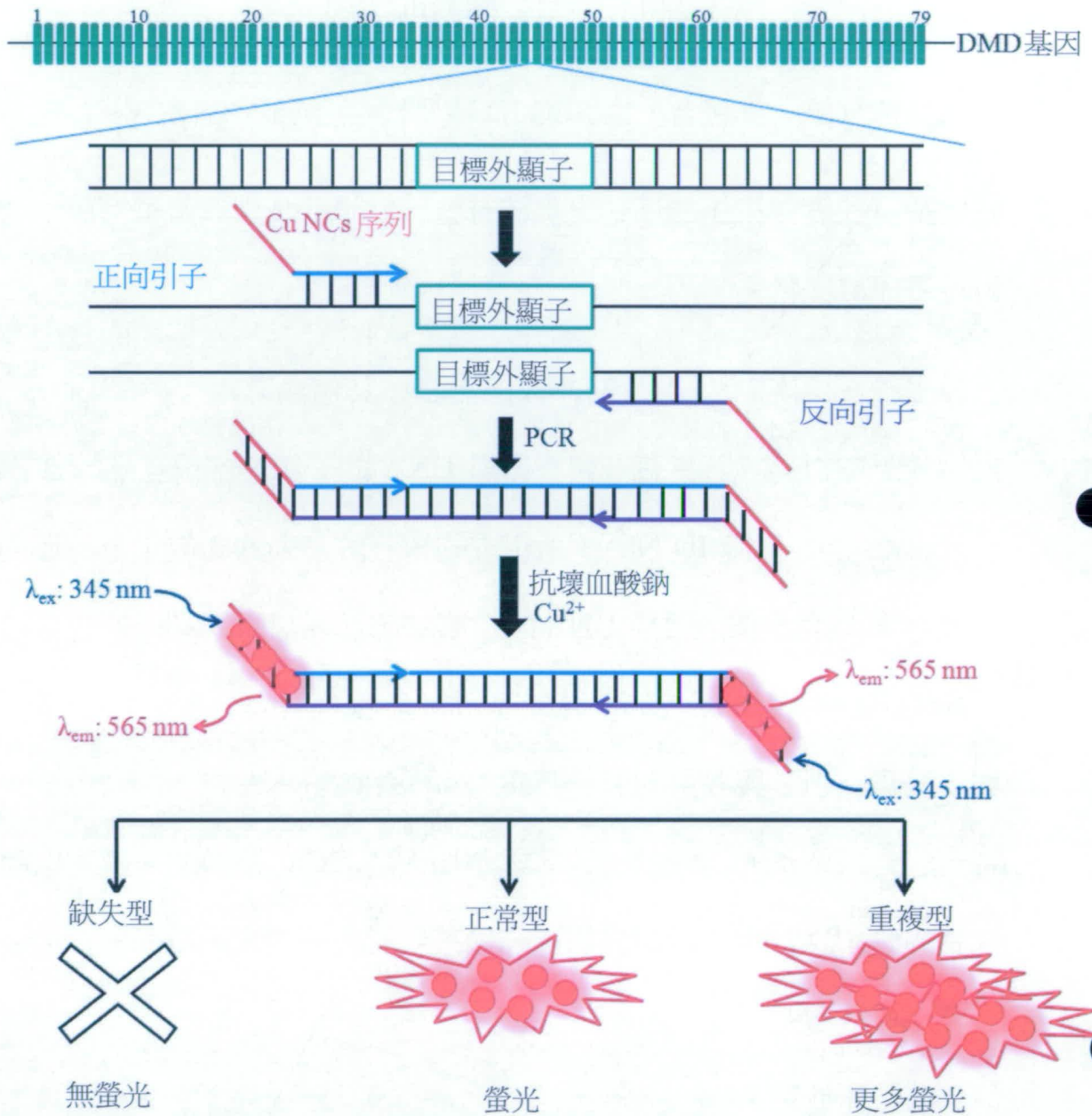


圖 1

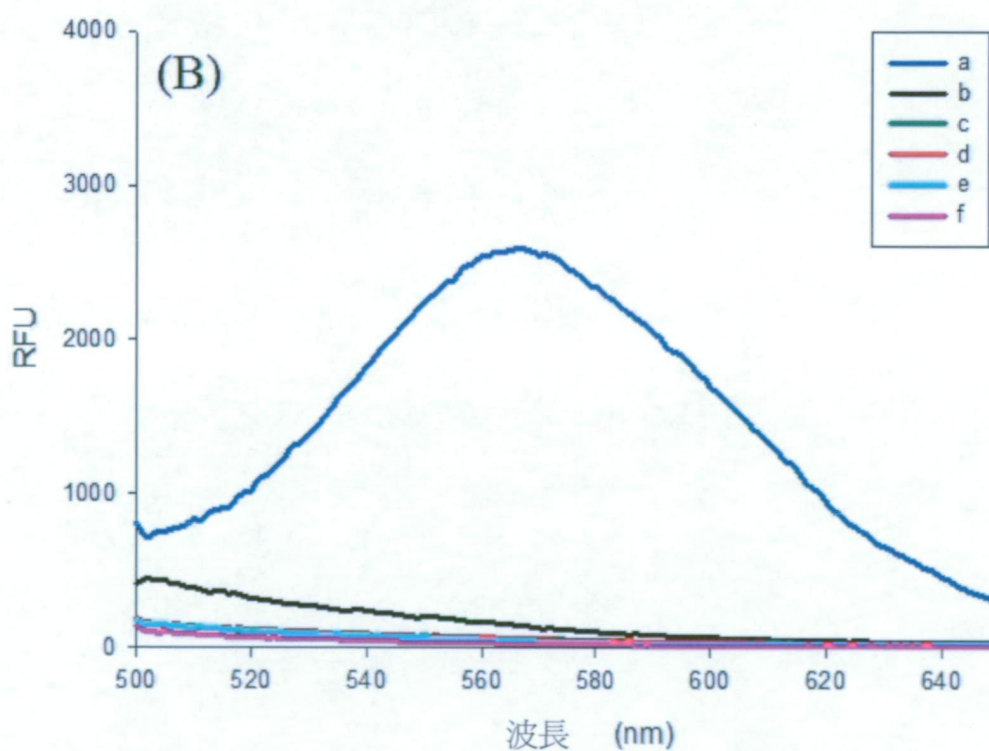
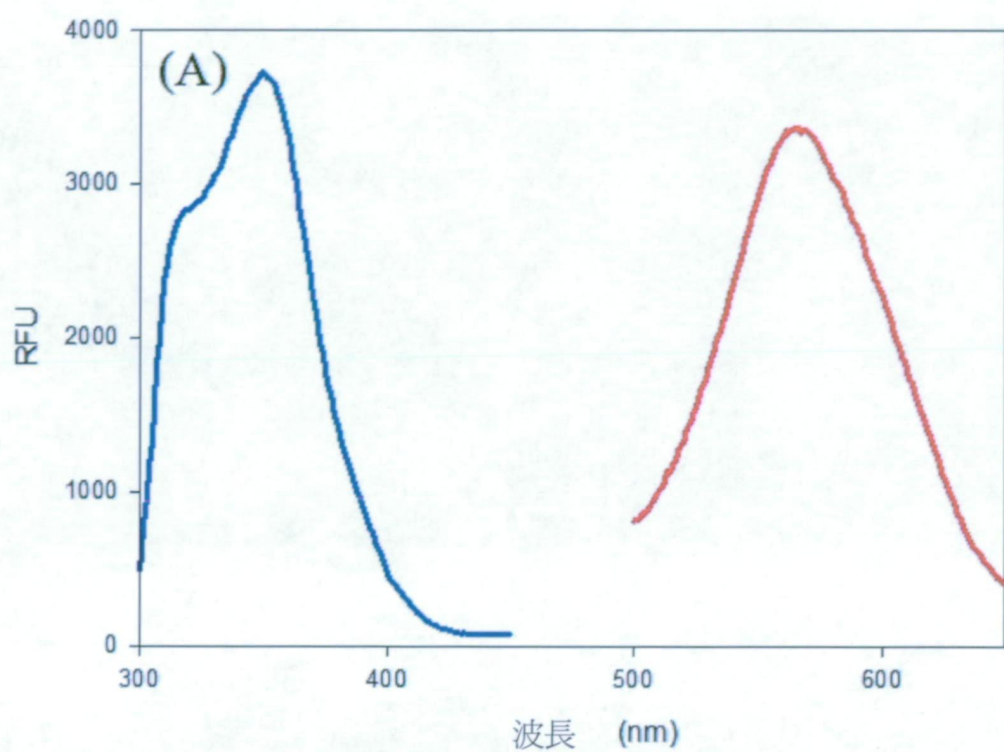


圖 2

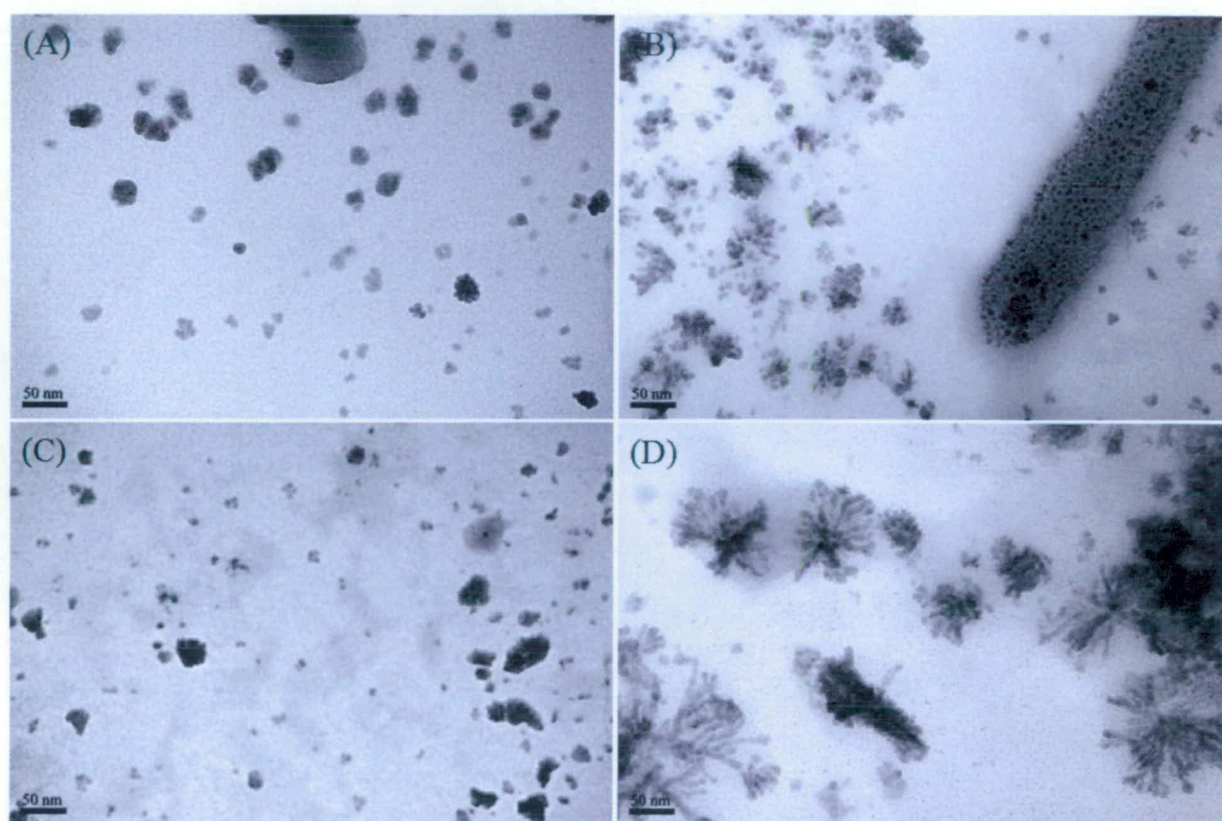


圖 3

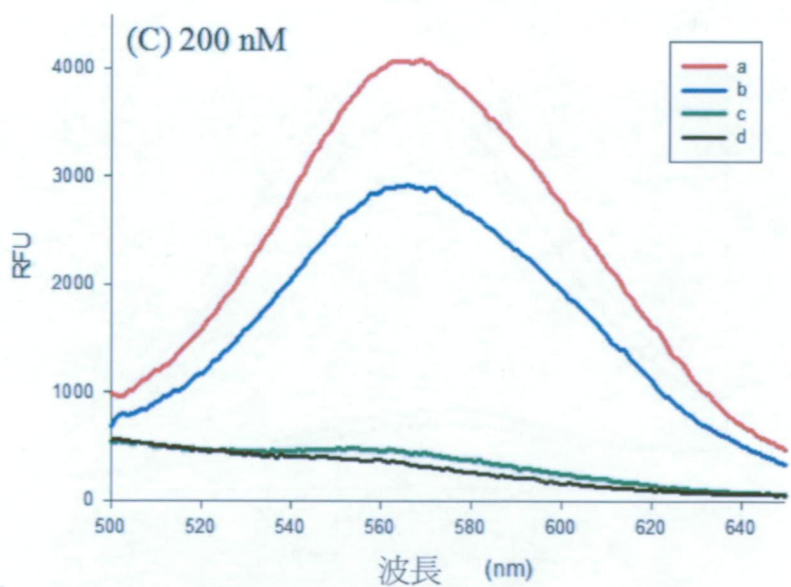
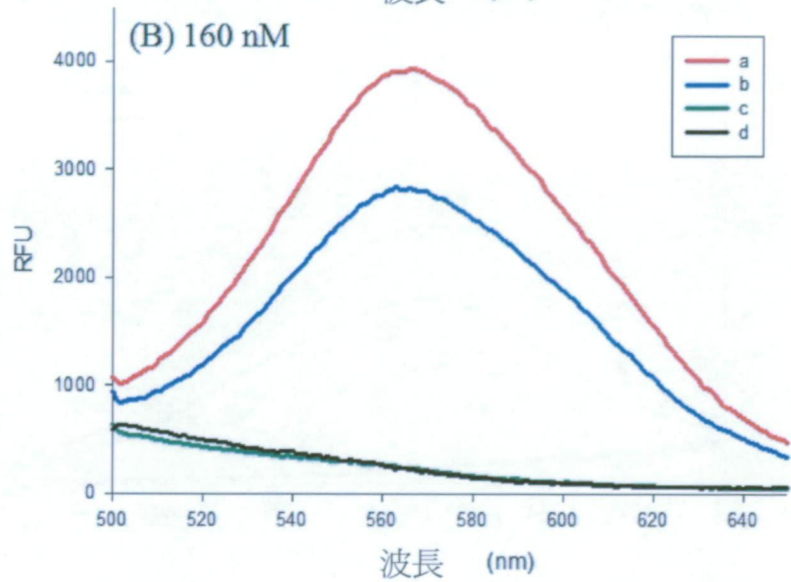
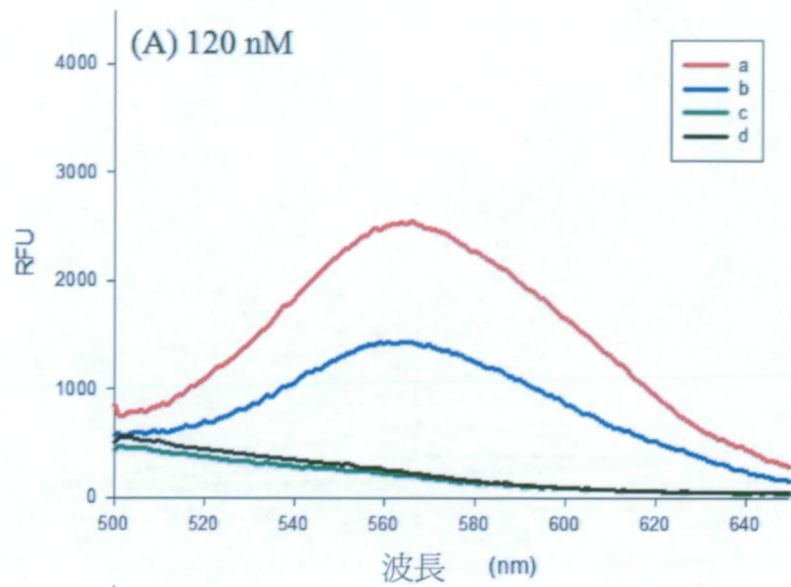


圖 4

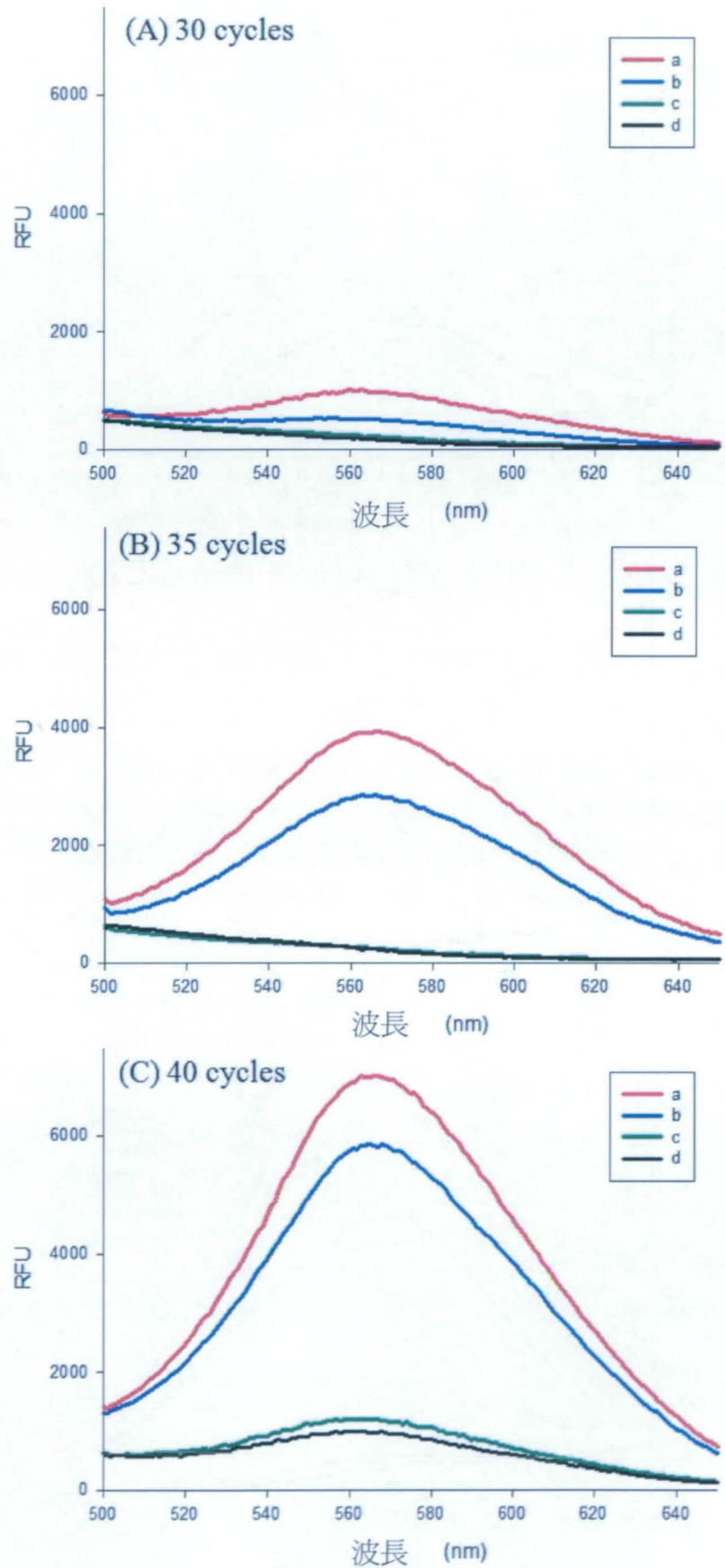


圖 5

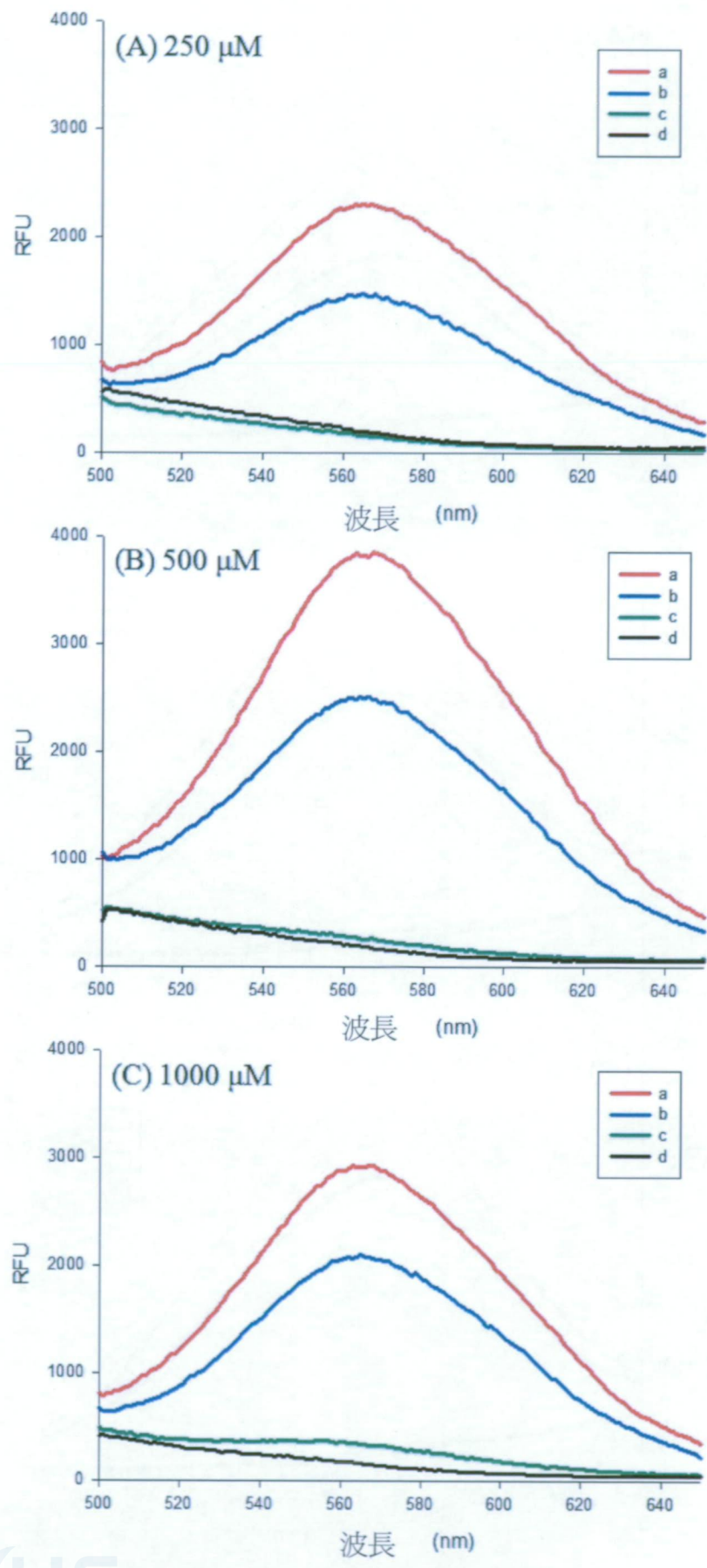


圖 6

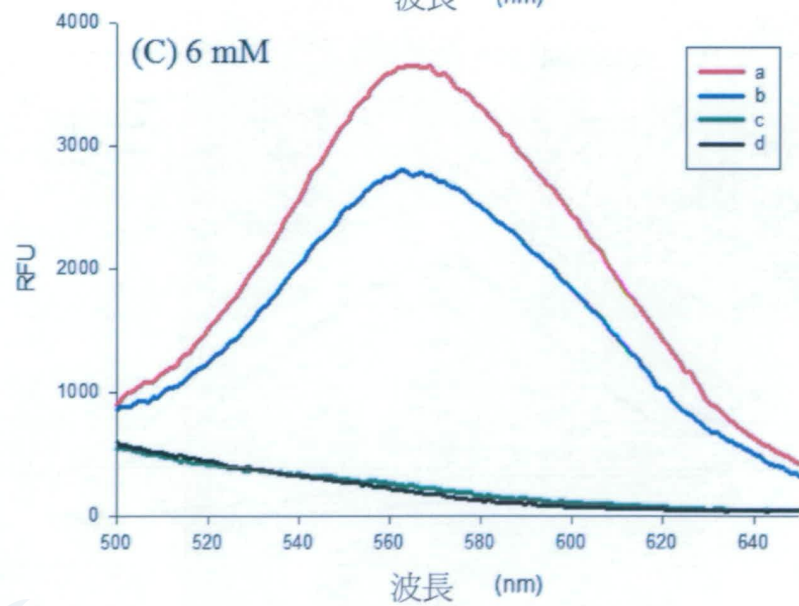
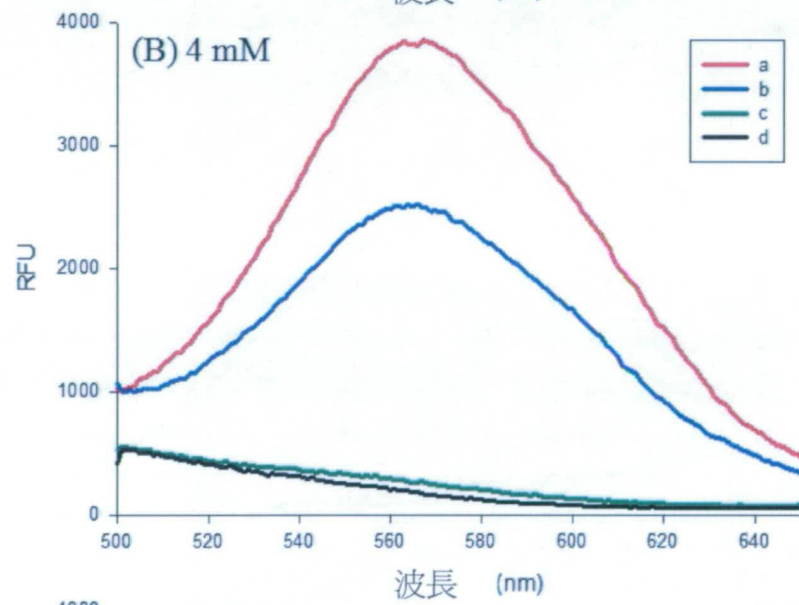
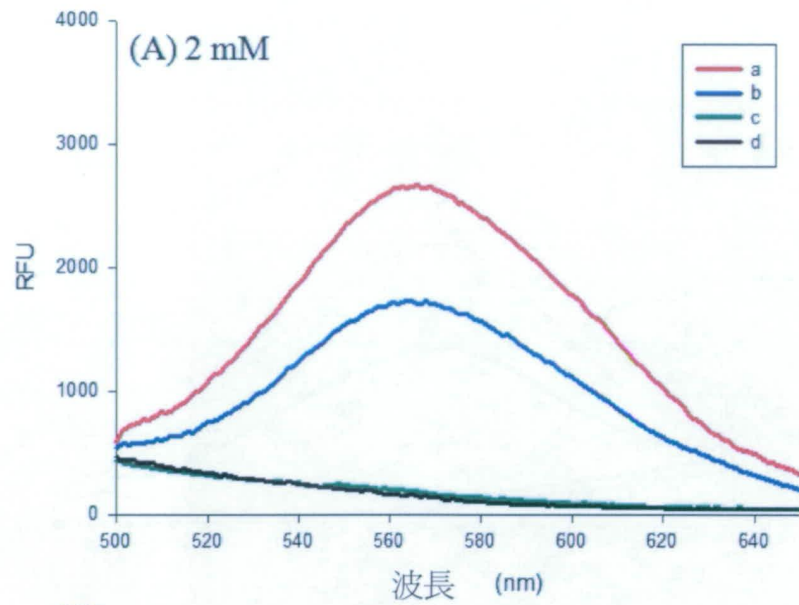


圖 7

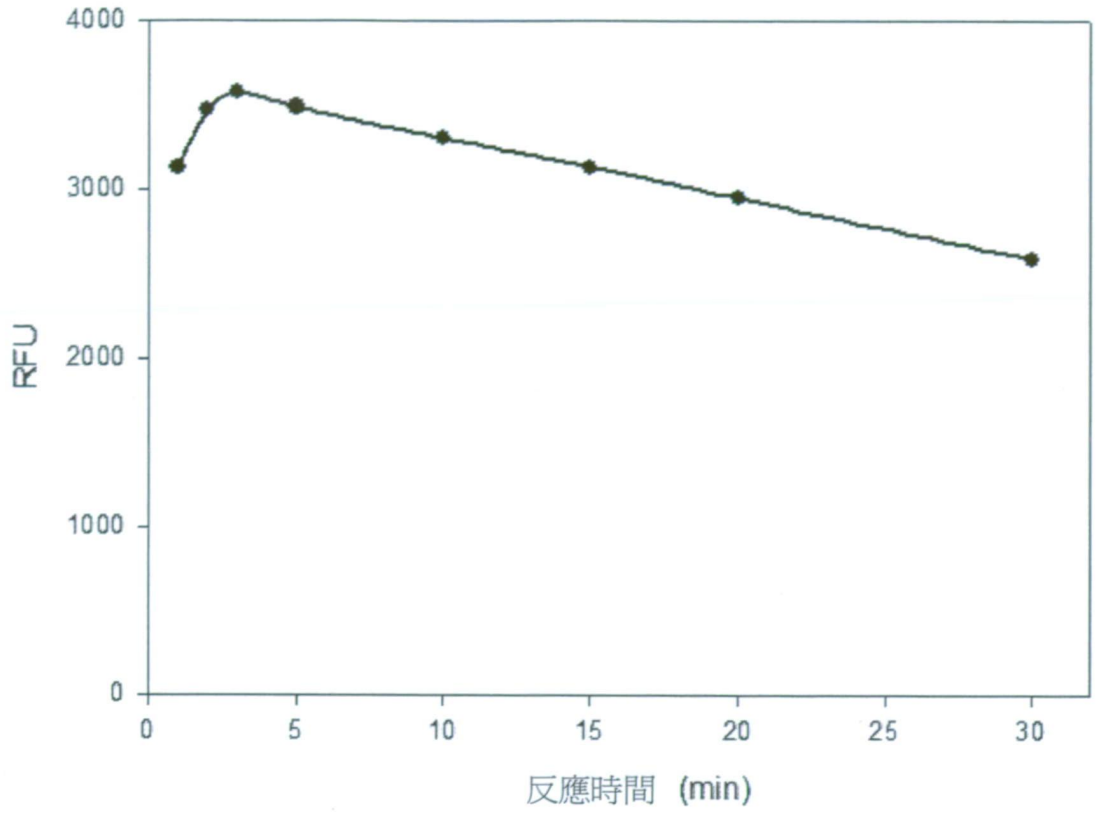


圖 8

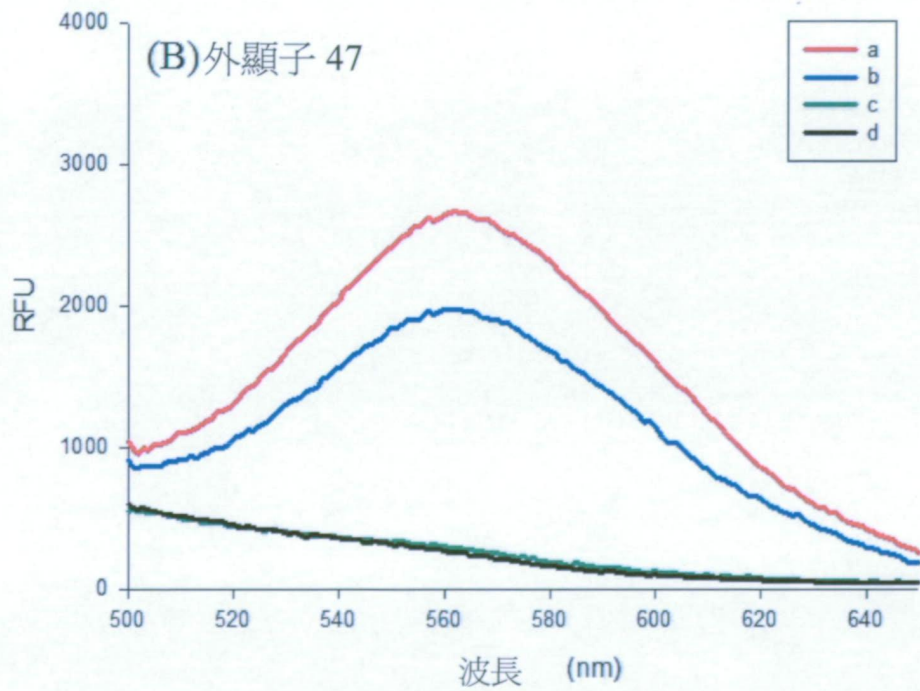
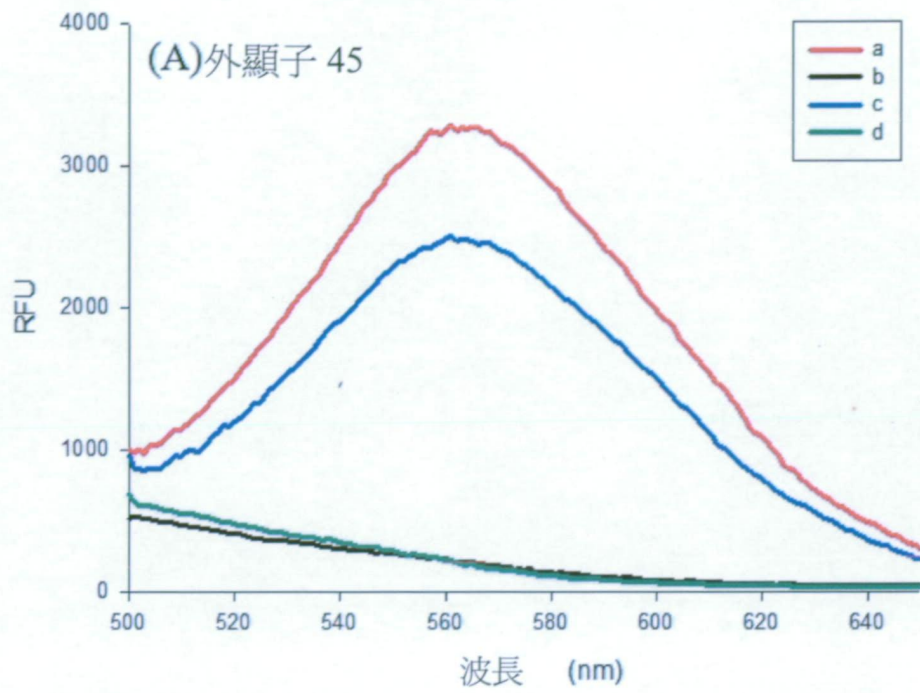


圖 9