

PHASiFY™ MAX

游离核酸提取试剂盒 (血浆)

用户操作手册

产品编号 1010100
1010200

www.phasescientific.com

PHASESCIENTIFIC



目录

PHASIFY™ 技术介绍	1
产品简介	1
PHASIFY™ MAX 1 mL 血浆	
产品组成图示 (1 mL 血浆)	2
试剂盒组成 (1 mL 血浆)	3
客户需自备的设备以及试剂	3
准备过程 (1 mL 血浆)	4
操作步骤 (1 mL 血浆)	4
PHASIFY™ MAX 2 mL 血浆	
产品组成图示 (2 mL 血浆)	6
试剂盒组成 (2 mL 血浆)	7
客户需自备的设备以及试剂	7
准备过程 (2 mL 血浆)	8
操作步骤 (2 mL 血浆)	8
储藏条件	10
产品适用范围	10
产品测试数据	11
操作中可能会出现的问题及解决方法	15
常见问题 (FAQs)	16
产品安全信息	17
技术协助	17
产品质量保证	18
附录 I: 全血血浆分离和储存	19

PHASIFY™ 技术

PHASIFY™ 是一项突破性的核酸提纯技术, 采用独有的双液相提取应用机制。这一新技术可显著改善DNA回收率, 并避免传统固相提取技术的常见缺点, 如小片段回收率低等。利用相达技术提取的高回收率、高浓度的游离核酸 (cfDNA) 样本, 大大拓展液体活检在生命科学研究和分子诊断领域的应用。

产品简介

PHASIFY™ MAX 游离核酸提取试剂盒专门用于从血浆中纯化浓缩游离核酸 (cfDNA), 和固相提取试剂盒相比, PHASIFY™ MAX 有更高的 cfDNA 回收率。

相达革命性的双液相技术提取的 cf/ctDNA 回收率比固相提取高出数倍。

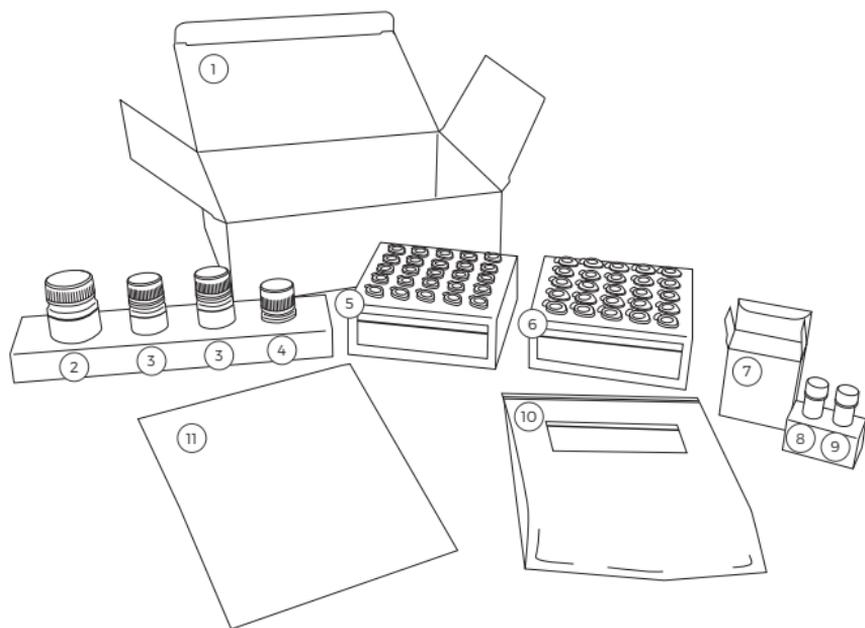
cfDNA是存在于血浆、血清和其他体液中的小片段核酸。主要由单核小体DNA片段 (约 170 bp) 组成, 亦可能含有一些双核小体 (约 300 bp) 和三核小体 (约 500 bp) 片段。近期研究发现在癌症患者和孕妇的血浆中含有肿瘤细胞和胎儿的游离核酸, 为癌症的液体活检和无创性产前检查提供了分子诊断的可能性。

PHASIFY™ MAX 游离核酸提取试剂盒采用独有的双液相提取应用机制, 能大幅提升纯游离DNA的能力, 利用相达的技术可以大大提升整体回收率。

样本用量:	反应次数:
1 mL 血浆	25
2 mL 血浆	25

产品组成图示 (1 mL 血浆)

Ref. No. 1010100



PHASiFY™ MAX 游离核酸提取试剂盒 - 1 mL

- | | | |
|-------------|-------------|-----------|
| ① 常温产品盒 (大) | ⑤ 溶液 B | ⑨ 溶液 D3 |
| ② 缓冲液 D2 | ⑥ 溶液 C | ⑩ 2mL 离心管 |
| ③ D1 | ⑦ 冷藏产品盒 (小) | ⑪ 快速使用指南 |
| ④ 溶液 A2 | ⑧ A1 | |

试剂盒组成 (1 mL 血浆)

PSM106b

组成	数量/装量	储存条件
常温产品盒		
溶液A2 (Solution A2)	3 mL	15-30°C
溶液B (Solution B)	25 x 460 µL	
溶液C (Solution C)	25 x 250 µL	
D1	2 x 8.7 g	
缓冲液D2 (Buffer D2)	20 mL	
2 mL 微型离心管 (2 mL microcentrifuge tube)	25 个	
冷藏产品盒		
A1	25 mg	4°C
溶液D3 (Solution D3)	70 µL	

客户需自备的设备以及试剂

设备以及耗材
恒温金属浴或水浴锅(可设置为37°C) 1.5 mL离心管(无核酸酶) 台式离心机(16,000 x g) 涡旋振荡器 移液器(量程可调) 消毒过的枪头(建议使用过滤型枪头)
试剂
40% (v/v) 异丙醇 - 分子级 100% 无水异丙醇 - 分子级 70% (v/v) 乙醇 - 分子级 无核酸酶水 重悬缓冲液

准备过程 (1 mL 血浆)

操作试验前, 请预先:

1. 将水/干浴预热至37°C (用于步骤1)
2. 制备试剂
 - a. **溶液 A1:**
在一瓶 25 mg 的A1加入 875 μ L 无核酸酶水, 混匀后保存于4°C。
 - b. **溶液 D1:**
在一瓶 8.7 g 的D1加入 8.7 mL 的缓冲液D2。这个反应会发热, 瓶子会升温。使用前需将瓶子温度冷却至室温。一瓶溶液适用于14次反应。可根据需要来准备此试剂。

操作步骤 (1 mL 血浆)

****除非另有注明, 否则以下步骤请于室温下操作**

1. 取一个新的 1.5 mL 离心管, 按顺序加入 30 μ L **溶液A1**、1 mL 血浆和 100 μ L **溶液A2**, 涡旋振荡混匀, 并微微离心分离。请勿直接单独混合溶液A1及溶液A2。
2. 将离心管于37°C放置15分钟。
3. 将提供的**溶液B**管微微离心(收集管盖上的液体)。将步骤2的离心管短暂涡旋振荡均匀, 并微微离心分离。将离心管中的所有液体加入到**溶液B**管中, 并涡旋振荡混匀。
4. 放入离心机 用7,000 \times g离心1分钟。
5. 将提供的**溶液C**管微微离心(收集管盖上的液体)。将**溶液B**管中所有的下相液加入**溶液C**。

提示: 提取所有目标液, 如渗有少量非目标液并不会影响结果。

6. 涡旋振荡均匀。放入离心机 用7,000 \times g离心1分钟。
7. 用移液枪转移 120 μ L 溶液C的红色上相到试剂盒提供的 2 mL 离心管中。

***提示: 稍微倾斜离心管便于提取上相液。尽量不要提取溶液C的下相。*

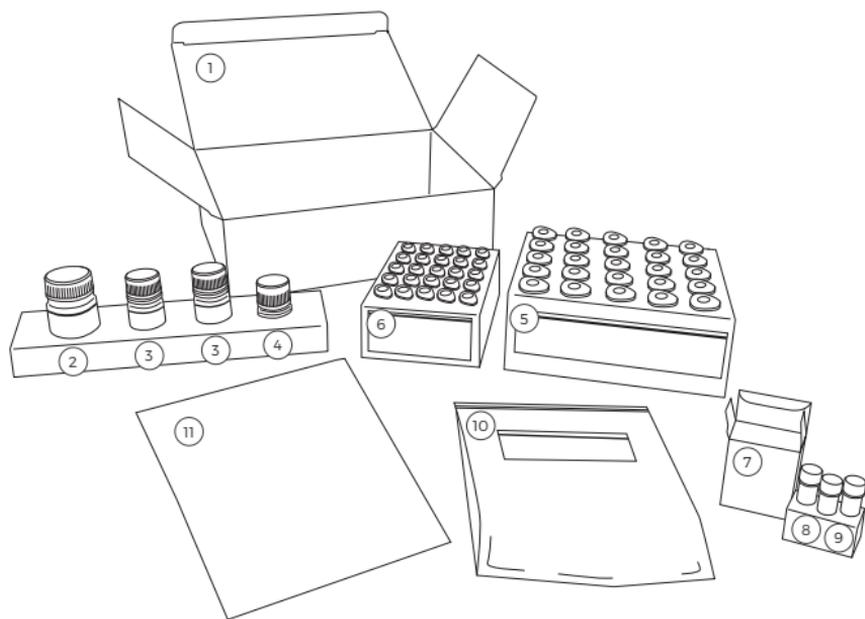
8. 转移到试剂盒提供的 2 mL 离心管后, 按顺序加入 740 μ L **溶液D1**、10 μ L **溶液D3**和 860 μ L 无水异丙醇, 涡旋振荡均匀。

9. 静置 5 分钟。
10. 将离心管接口朝外,用 16,000 × g 离心5分钟。
11. 注意沉淀颗粒的位置,小心清除所有上清液,并加入 1 mL 40% 异丙醇。不要碰破或涡旋振荡沉淀颗粒。
12. 将离心管接口朝外,用 16,000 × g 离心2分钟。
13. 小心清除所有上清液,加入 1 mL 冷的 70% 乙醇。枪头不要碰到或涡旋振荡沉淀颗粒。
14. 将离心管接口朝外,以 16,000 x g 离心2 分钟。
15. 清除所有上清液,打开离心管、并置于室温晾干沉淀颗粒10分钟(备注:过度干燥会让 DNA沉淀颗粒较难溶解)。
16. 加入 5- 100 μL的(自选)缓冲液重悬沉淀颗粒。

纯提出来的DNA可立即使用或储存在-20°C或更低温度中作长期保存。

产品组成图示 (2 mL 血浆)

Ref. No. 1010200



PHASIFY™ MAX 游离核酸提取试剂盒 - 2 mL

- | | | |
|-------------|-------------|------------|
| ① 常温产品盒 (大) | ⑤ 溶液 B | ⑨ 溶液 D3 |
| ② 缓冲液 D2 | ⑥ 溶液 C | ⑩ 2 mL 离心管 |
| ③ D1 | ⑦ 冷藏产品盒 (小) | ⑪ 快速使用指南 |
| ④ 溶液 A2 | ⑧ A1 | |

试剂盒组成 (2 mL 血浆)

PSM.205

组成	数量/装量	储存条件
常温产品盒		
溶液A2 (Solution A2)	6 mL	15-30°C
溶液B (Solution B)	25 x 1170 µL	
溶液C (Solution C)	25 x 270 µL	
D1	2 x 8.7 g	
缓冲液D2 (Buffer D2)	20 mL	
2 mL 微型离心管 (2 mL microcentrifuge tube)	25 个	
冷藏产品盒		
A1	2 x 25 mg	4°C
溶液 D3	70 µL	

客户需自备的设备以及试剂

设备以及耗材
恒温金属浴或水浴锅(可设置为37°C) 15 mL 离心管(无核酸酶) 台式离心机(16,000 x g) 离心机 (2,300 x g) 涡旋振荡器 移液器(量程可调) 消毒过的枪头(建议使用过滤型枪头)
冷藏盒
40% (v/v) 异丙醇 - 分子级 100% 无水异丙醇 - 分子级 70% (v/v) 乙醇 - 分子级 无核酸酶水 重悬缓冲液

准备过程 (2 mL 血浆)

操作试验前, 请预先:

1. 将水/干浴预热至37°C (用于步骤1)
2. 制备试剂
 - a. **溶液 A1:**
在一瓶 25 mg 的A1加入 875 μ L 无核酸酶水, 混匀后保存于4°C。一瓶溶液适用于14次反应。可根据需要来准备此试剂。
 - b. **溶液 D1:**
在一瓶 8.7 g 的D1加入 8.7 mL 的缓冲液D2。这个反应会放热, 瓶子会升温。使用前需将瓶子温度冷却至室温。一瓶溶液适用于14次反应。可根据需要来准备此试剂。

操作步骤 (2 mL 血浆)

****除非另有注明, 否则以下步骤请于室温下操作**

1. 取一个新的15 mL 离心管, 按顺序加入 60 μ L **溶液A1**、2 mL 血浆和 200 μ L **溶液A2**, 涡旋振荡混匀, 并微微离心分离。请勿直接单独混合溶液A1及溶液A2。
2. 将离心管于 37°C 放置15分钟。
3. 将提供的**溶液B**管微微离心(收集管盖上的液体)。将步骤二的离心管短暂涡旋振荡均匀, 并微微离心分离。将离心管中的所有液体加入到**溶液B**管中, 并涡旋振荡混匀。
4. 放入离心机用2,300 \times g 离心 6 分钟。
5. 将提供的**溶液C**管微微离心(收集管盖上的液体)。将**溶液B**管中的所有下相加入**溶液C**。
提示: 提取所有目标液, 如渗有少量非目标液并不会影响结果。
6. 短暂涡旋振荡均匀。放入离心机用 7,000 \times g 离心1分钟。
7. 用移液枪转移 120 μ L **溶液C**的红色上相到试剂盒提供的 2 mL 离心管中。
***提示: 稍微倾斜离心管便于提取上相液。尽量不要提取溶液C的下相。*
8. 按序加入 740 μ L **溶液D1**、2 μ L**溶液D3**和 860 μ L 无水异丙醇, 涡旋振荡均匀。

9. 静置 5 分钟。
10. 将离心管接口朝外,用 16,000 × g 离心 5 分钟。
11. 注意沉淀颗粒的位置,小心清除所有上清液,并加入 1 mL 40% 异丙醇。不要碰破或涡旋振荡沉淀颗粒。
12. 将离心管接口朝外,用 16,000 × g 离心 2 分钟。
13. 小心清除所有上清液,加入 1 mL 的 70% 乙醇。枪头不要碰到或涡旋振荡沉淀颗粒。
14. 将离心管接口朝外,以 16,000 × g 离心 2 分钟
15. 清除所有上清液,打开离心管、并置于室温晾干沉淀颗粒 10 分钟(过度干燥会让DNA沉淀颗粒较难溶解)
16. 加入 5- 100 μL 的 (自选) 缓冲液重悬沉淀颗粒。

纯提出来的DNA可立即使用或储存在-20°C或更低温度中作长期保存。

储藏条件

常温产品盒应储存于 15-30°C, 避光保存。冷藏产品盒 (包含 A1 和溶液D3) 应储存在 4°C。

在以上储存条件下, 所有试剂能保存12个月。

D1 (无论是粉末或是溶液) 应避光并在干燥环境下储存。请在使用前再配置溶液D1, 剩余的溶液D1 可在室温下保存 6 个月。当溶液D1呈现黄色时, 则不可再使用。

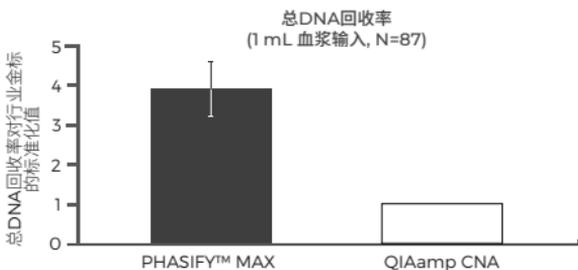
产品适用范围

本产品专门用于分子生物学的相关实验使用。本产品并不适用于疾病诊断、预防或治疗。此试剂盒只适用于人类全血样本制备的血浆, 不适用于产品声明以外的任何用途。

产品测试数据

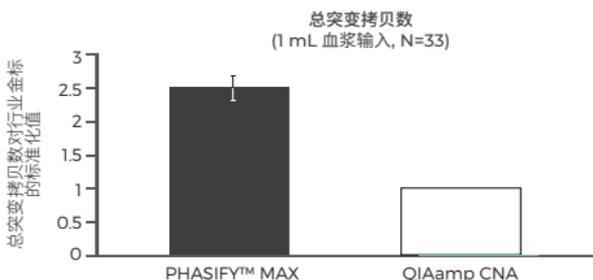
在全球顶尖安德森癌症研究中心 (MD Anderson) 使用PHASIFY™ MAX和固相提取技术的产品 (Qiagen QIAamp游离核酸提取试剂盒) 进行的一项头对头的研究中, PHASIFY™ MAX提取的cfDNA产量是Qiagen QIAamp的三倍, 并且能够从癌症患者的血浆中检测到更多的突变基因。

I. 在癌症患者血浆中提取的DNA总回收率有大幅提升



图表 1 - 分别使用PHASIFY™ MAX 游离核酸提取试剂盒和QIAamp CNA产品从 1 mL 癌症患者样本中提取的总DNA回收率 (利用Quant-iT™ PicoGreen™ dsDNA Assay Kit来测定; n=89)。数据显示, PHASIFY™ MAX 提取的总DNA回收率是QIAamp CNA的3.8倍 (p-value <0.0001 Wilcoxon Signed-Rank)。以上数据排除了2个离群值, 分别显示PHASIFY™ MAX 的总DNA回收率对比QIAamp CNA提升了209倍及800倍。

II. 在癌症患者血浆中提取的ctDNA总回收率有大幅提升



图表 2 - 在89个癌症患者样本中, 使用PHASIFY™ MAX 游离核酸提取试剂盒和QIAamp CNA产品可检测出33个含有BRAF、KRAS或NRAS突变基因的样本 (利用ddPCR来测定突变基因)。数据显示, PHASIFY™ MAX 在样本中提取的突变基因拷贝数是QIAamp CNA的2.4倍 (中位数2.7倍, p-value 0.0006 Wilcoxon Signed-Rank)。

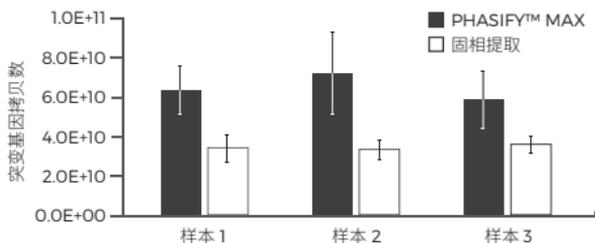
III. PHASIFY™ MAX 可以检测到更多的突变基因

癌症类型	PHASIFY™ MAX (MAF)	QIAamp CNA (MAF)
胰腺癌	0.35%	未检测到
胰腺癌	0.65%	未检测到
胰腺癌	0.41%	未检测到
阑尾癌	0.35%	未检测到
卵巢癌	2.80%	未检测到
卵巢癌	0.44%	未检测到
结直肠癌	2.10%	未检测到
结直肠癌	0.24%	未检测到
结直肠癌	0.27%	未检测到
结直肠癌	0.25%	未检测到
结直肠癌	0.50%	未检测到
结直肠癌	0.35%	未检测到
结直肠癌	0.58%	未检测到

MAF = 突变基因频率

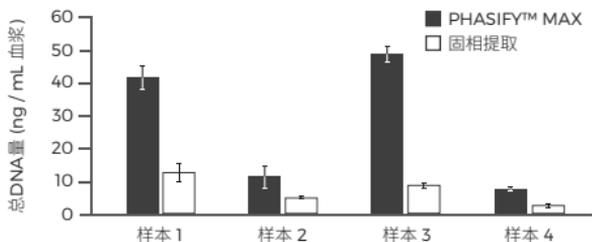
图表 3 - 使用PHASIFY™ MAX游离核酸提取试剂盒可在13个样本中检测到QIAamp CNA未能检测到的突变基因。

IV. 大大提升目标核酸的回收率



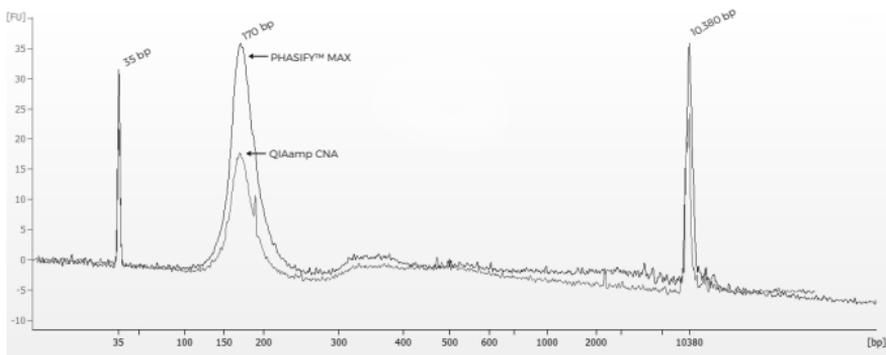
图表 4

图表 4 - 将3个不同源头的 1 mL 健康血浆样本中分别注入 25 ng 的 145 bp 的 DNA 片段, 使用 PHASIFY™ MAX 和固相提取产品提取 cfDNA, 并利用 ddPCR 来确定 145 bp DNA 片段的回收率。



图表 5

图表 5 - 使用 PHASIFY™ MAX 游离核酸提取试剂盒和固相提取产品从四个 1 mL 健康血浆样本中 (n ≥ 3) 提取 cfDNA。我们利用 Qubit 来量化血浆 DNA 的总回收量, 并且利用探针/引物做 ddPCR 来量化与检测 EGFR DNA 序列 (数据没有披露)。



图表 6 - 使用PHASIFY™ MAX 游离核酸提取试剂盒和QIAamp CNA产品从1 mL 健康血浆样本中提取cfDNA, 并利用Agilent Bioanalyzer 2100来分析提取的DNA。注: 于35 bp 和10,380 bp 显示的数据是内标物的讯号。

Qubit, ddPCR 和bioanalyzer 的健康血浆分析结果表明了PHASIFY™ MAX 游离核酸提取试剂盒能改善cfDNA的提取量。

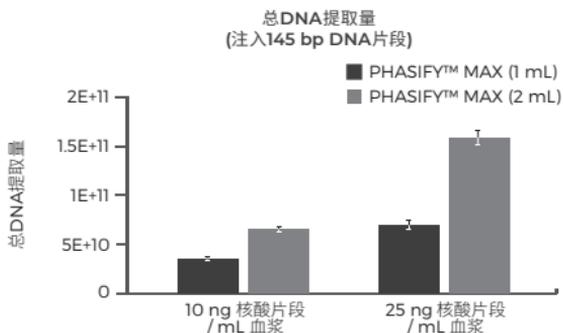
V. 提取结果的重复性

PHASIFY™ MAX 游离核酸提取试剂盒的测试结果稳定性高, 在不同样本测试中具有高度重复性。

血浆编号	样本 1	样本 2	样本 3	样本 4
总DNA 回收率 (ng)	41.13	11.93	5.25	2.69
	42.38	11.66	5.61	2.04

图表 7 - 使用 PHASIFY™ MAX 从四个不同捐赠者样本 (n=4) 的1 mL 血浆中重复提取DNA, 并利用Qubit测定DNA 的总提取量。

VI. PHASIFY™ MAX 在不同的样本输入量下可保持稳定的DNA回收率



图表 7 - 将145bp片段DNA分别以10ng/mL和25ng/mL的浓度注入健康血浆中, 使用PHASIFY™ MAX的1 mL和2 mL试剂盒进行提取, 并采用基于探针的ddPCR方法检测145bp的DNA片段回收率。

操作中可能会出现的问题及解决方法

问题	原因和建议的解决方法
在第五步或第七步中,不小心吸取了非目标液相	<ul style="list-style-type: none"> 吸取少量非目标液相 (少于10%的容量) 不会严重影响最终提取结果
在离心分离后不小心跌落了装着溶液B或溶液C的离心管,溶液分层被破坏。	<ul style="list-style-type: none"> 溶液B或溶液C管在离心分层后不小心掉落,上相和下相可能相互混合。如发生以上状况,重复离心步骤,两液相将再次分离。
DNA的产量比预期的低	<p>DNA的回收率可以被很多不同的因素影响,例如:</p> <ul style="list-style-type: none"> 在DNA含量低的情况下,增加血浆样本量和反应次数,将多次反应的沉淀颗粒合并。 在涡旋期间(第一、三、六和八步)溶液不够均匀。重新彻底涡旋直至出现均匀的浑浊液。 在步骤一中,由于溶液添加顺序不正确,血浆样本的消化/裂解效率下降。避免将溶液A1与溶液A2直接混合,这会降低消化/裂解活性。溶液D1配制不正确。检查溶液D1是否按照正确步骤配制。不正确的配制可能会导致DNA沉淀效率下降。 不完全重悬沉淀。通过轻度涡旋或上下移液将沉淀完全重悬。
离心分离装有溶液B的离心管后,液相没有分层。	<ul style="list-style-type: none"> 血浆输入不足/过多。为了获得最佳性能,请使用试剂盒上指示的血浆输入量。 在之前的步骤里,添加了过量的试剂。仔细检查所需的试剂添加量。
第四步后下层液相体积异常	<ul style="list-style-type: none"> 这可能是由于血浆和溶液B的混合不当引起。再彻底地涡旋直至出现均匀的浑浊液,然后再离心分离。
离心分离装有溶液C的离心管后,液相没有分层	<ul style="list-style-type: none"> 这可能是从溶液B到溶液C的移液期间的下层相不足引起。检测溶液B下层液相是否完全转移到溶液C管中。
溶液C的上层液相少于操作建议提取的容量	<ul style="list-style-type: none"> 从溶液B到溶液C的底部相转移不足。将所有顶部相转移至下一步,用水加满至所需量(例如,如果溶液C顶部相转移体积为100μL,则再添加20 μL水)。 这可能是由于血浆和溶液B的混合不当引起。再彻底地涡旋直至出现均匀的浑浊液,然后再离心分离。
在第十四步后,沉淀颗粒看起来异常(例如:杂质、凝胶状颗粒)	<ul style="list-style-type: none"> 这可能是由于过量的溶液C中下层液相(错误液相)被意外转移。重复第十三和第十四步,在进行第十五步前重复进行70%乙醇洗涤步骤。 注意:洗涤步骤过多可引致DNA提取的不足。
沉淀颗粒很难重悬	<ul style="list-style-type: none"> 这可能是由于过度干燥。加入重悬缓冲液并轻轻涡旋振荡试管,稍微离心分离,然后先静置再冷藏。建议干燥后立即重悬DNA沉淀颗粒。

常问问题 (FAQs)

是否可用小于试剂盒上标示的血浆量?

如果血浆输入量小于试剂盒上标示的量,我们会建议将样本用 1x PBS (pH7.4)稀释至指定的样本量。但是,我们不建议使用少于80% v/v 的血浆。

是否可用多于试剂盒上标示的血浆量?

如果血浆输入量多于试剂盒上标示的量,可能会影响液相成形。我们建议使用试剂盒上标示的血浆量。

在第四步后,会有多少下层液相在溶液B里?

在受控的环境下,下层液相的范围分别是800至860 μL [1 mL输入] 和 900-950 μL [2 mL输入]。不管多少量,我们建议提取所有下层液相。

在第五步和第七步,最多可以抽取多少的非目标液相?

这视乎提取的DNA的下游应用。任何错误的转移都可能影响结果。在不会影响提取结果的前提下,最多能抽取到10% 的非目标液相。不过在第七步的操作中,过多下层液相可引致沉淀颗粒纯度下降。建议移液期间不要出错。

在第六步中,可以吸取大于 120 μL 的溶液C中的红色上层液相吗?

我们建议只转移120 μL 的红色上层液相。虽然转移多一点上层液相可导致更高的回收率,但也增加了在移液期间,意外地转移下层液相的污染物的风险。我们建议提取指定量的上相液。

应如何提高样品的纯度?

可在70%乙醇之前用40%异丙醇洗脱沉淀颗粒,来提高样本的纯度,注意,额外的洗涤步骤可能会降低DNA的回收率。

产品安全信息

进行化学品试验操作时,请穿上规范的实验室外套、一次性手套和护目镜。如需更多信息,并参阅相应的化学品安全说明书(SDSs);如需详细文件可在本公司网站www.phasescientific.com下载。

若含有这些缓冲液的液体溢出,请用合适的实验室洗涤剂和水清洁。若溢出的液体含有传染性物质,请先用实验室清洁剂和水清洗受影响的区域,再用1%(v/v)漂白剂清洗。

不要将漂白剂直接添加到含有乙醇或异丙醇的废物中,因为反应会释放氯仿。

请确保废物按照当地适用的法规进行储存、转移、运输和处置。

技术协助

如果您对PHASIFY™ MAX 游离核酸提取试剂盒有任何疑问,请随时通过以下方式联系我们:

Email: phasify@phasesci.com
服务热线: + (852) 3892-7200

相达技术协助部门会尽力解决您遇到的问题。

产品质量保证

我们保证我们提供的产品符合本手册的规格。质保时间由交付产品到产品到期日或使用日期为止。若我们没有注明到期时间，质保期即是自产品交付起的12个月之内。

本产品仅可根据本产品手册提供的操作步骤使用，且仅可与套件中包含的组件一起使用。此试剂盒及其组件是一次性使用，不得重复使用、改装或转售。

如本公司测定客户更改或误用了产品，或未能按照我方提供的指示储存产品，我们的产品保证即将无效。根据本规定，本公司在确认产品有缺陷之后（采用本公司认可的分析方法），可免费更换该产品。

附录 I: 全血血浆分离和储存

设备以及耗材

采血管

1.5 或 2.0 mL 微型离心管(无核酸酶)

15 mL 或 50 mL 锥形管(可选项)

旋翼式离心机(设置至4°C)

高速微型离心机(设置至4°C)

步骤

1. 用采血管采集血液。
2. 用旋翼式离心机 $1,600 \times g$ 4°C 离心20分钟。
3. 小心地将血浆转移到新的微离心管中(不要碰到白膜层)。
4. 用 $16,000 \times g$ 4°C 离心5分钟来清除残留的血球细胞和碎片。
5. 提取血浆部分, 并长期储存在 -80°C。

香港总部

香港九龙观塘兴业街29号万有引力32及33楼

美国南加州

10527 GARDEN GROVE BOULEVARD
GARDEN GROVE, CA 92843, U.S.A.

中国苏州

中国江苏苏州工业园区苏州中心广场办公楼
A座2804 邮编215021

<http://www.phasescientific.com>

技术协助

服务热线: +(852) 3892 7200
电邮: phasify@phasesci.com

容如有变更, 恕不另行通知。有关最新产品信息, 请浏览www.phasescientific.com。

PM00UM2032.PSM.106b-PSM.205 | PI-1010X00CN | Ver A | 仅供研究使用 | 不适用于诊断程序 |
© 2020 PHASE Scientific Int'l Ltd. 版权所有

有限许可协议

购买或使用此PHASIFY™MAX 游离核酸提取试剂盒表明同意以下条款:

1. PHASIFY™ MAX 游离核酸提取试剂盒只能使用本产品附带的组分内容按照产品说明书中的步骤或者公司官网www.phasescientific.com中的说明进行操作, 对非此产品内容、使用其他技术或操作方式的行为不负有任何责任。
2. 本产品及其组份仅供一次性使用, 不得重复使用, 翻新或转售。
3. 相达生物科技除明确声明的许可以外, 公司对其他明示或暗示的许可不符的任何形式的保证。