



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 118483432 A

(43) 申请公布日 2024.08.13

(21) 申请号 202410424289.3

C07K 16/18 (2006.01)

(22) 申请日 2024.04.10

(71) 申请人 陕西脉元生物科技有限公司

地址 710311 陕西省西安市高新区草堂科技产业基地秦岭大道西2号科技企业加速器园区1期八号楼1-3-2.1-2-2

(72) 发明人 李科 闫亚平 郭俊 王瑜

张哲玮 孙敏敏 席倩 柴单单  
任妮 杨梓 刘柯欣 苏兆鹏  
满一霖 刘慧 刘瑞曼 高雪婷

(74) 专利代理机构 北京高沃律师事务所 11569

专利代理师 刘奇

(51) Int. Cl.

G01N 33/68 (2006.01)

C07K 14/47 (2006.01)

权利要求书1页 说明书12页

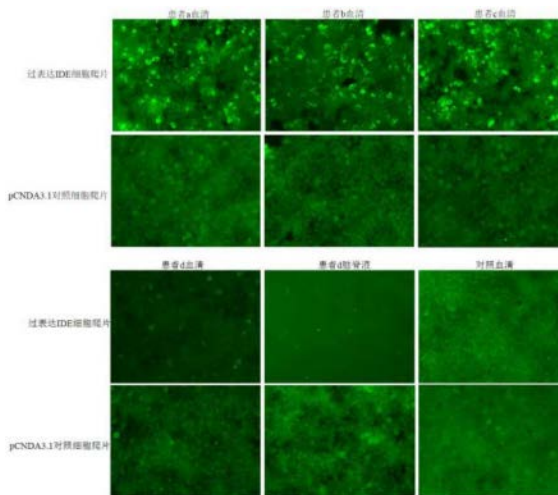
序列表(电子公布) 附图8页

(54) 发明名称

检测抗IDE自身抗体的试剂在检测和/或诊断神经系统自身免疫疾病中的应用

(57) 摘要

本发明属于生物医药技术领域,具体涉及检测抗IDE自身抗体的试剂在检测和/或诊断神经系统自身免疫疾病中的应用。本发明对比患有神经系统自身免疫疾病的患者血清和健康人血清,发现存在于患者血清而不存在于健康人血清的信号:识别IDE抗原的自身抗体,并通过检测神经系统疾病患者血清和健康人血清,发现健康人均均为抗IDE自身抗体阴性,大部分神经系统疾病患者抗IDE自身抗体阳性,确定了抗IDE自身抗体可以作为诊断神经系统自身免疫疾病的标志物,丰富了鉴别神经系统自身免疫疾病生物标志物,提高神经系统自身免疫疾病的诊断的准确性,尤其是能实现神经系统自身免疫疾病的辅助诊断。



1. 检测抗IDE自身抗体的试剂在制备检测和/或诊断神经系统自身免疫疾病的产品中的应用。

2. 根据权利要求1所述的应用,其特征在于,所述检测抗IDE自身抗体的试剂包括IDE蛋白、表达IDE蛋白的细胞、表达IDE蛋白的组织和IDE蛋白的裂解物中的一种或多种。

3. 根据权利要求2所述的应用,其特征在于,所述IDE蛋白的氨基酸序列包括a) ~ c)中的任意一种:

a) SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列;

b) SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列的10% ~ 80%,并且可以识别抗IDE自身抗体的氨基酸序列;

c) a) 或 b) 中的氨基酸序列经修饰或突变后,并且可以识别抗IDE自身抗体的氨基酸序列。

4. 根据权利要求3所述的应用,其特征在于,所述修饰包括糖基化修饰、磷酸化修饰、乙酰化修饰、甲基化修饰和泛素化修饰中的一种或多种。

5. 根据权利要求3所述的应用,其特征在于,编码所述IDE蛋白的氨基酸序列的核苷酸序列包括I) ~ III)中的任意一种:

I) SEQ ID NO.3所示的核苷酸序列;

II) SEQ ID NO.3所示的核苷酸序列的10% ~ 80%,并且编码的氨基酸序列可识别抗IDE自身抗体;

III) I) 或 II) 中的核苷酸序列经修饰或突变后,编码的氨基酸序列可识别抗IDE自身抗体。

6. 根据权利要求1所述的应用,其特征在于,所述神经系统自身免疫疾病的症状包括头痛,发烧,肌肉酸疼,呕吐,失眠,打鼾,步态异常,记忆下降,吞咽困难,精神异常,癫痫发作,认知功能障碍,语言障碍,意识障碍和运动障碍中的一种或多种。

7. 根据权利要求6所述的应用,其特征在于,所述神经系统自身免疫疾病为自身免疫性脑炎。

8. 一种检测和/或诊断神经系统自身免疫疾病的试剂盒,其特征在于,包括检测抗IDE自身抗体的试剂和标记抗体。

9. 根据权利要求8所述的试剂盒,其特征在于,所述检测抗IDE自身抗体的试剂包括IDE蛋白、表达IDE蛋白的细胞、表达IDE蛋白的组织和含IDE蛋白的组织中的一种或多种。

10. 根据权利要求9所述的试剂盒,其特征在于,所述IDE蛋白的氨基酸序列包括a) ~ c)中的任意一种:

a) SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列;

b) SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列的10% ~ 80%,并且可以识别抗IDE自身抗体的氨基酸序列;

c) a) 或 b) 中的氨基酸序列经修饰或突变后,并且可以识别抗IDE自身抗体的氨基酸序列。

## 检测抗IDE自身抗体的试剂在检测和/或诊断神经系统自身免疫疾病中的应用

### 技术领域

[0001] 本发明属于生物医药技术领域,具体涉及检测抗IDE自身抗体的试剂在诊断神经系统自身免疫疾病中的应用。

### 背景技术

[0002] 神经系统自身免疫疾病是人体免疫系统错误地攻击自身神经系统而造成神经系统组织结构和功能损伤的一类疾病。该类疾病损伤范围广泛,临床表现复杂多样,可以累及中枢神经系统、周围神经系统以及神经-肌肉接头处,导致神经元或轴索损伤、髓鞘脱失、神经-肌肉接头破坏等病理改变。常见的神经系统自身免疫性疾病包括:自身免疫性脑炎(autoimmune encephalitis,AE)、中枢神经系统(central nervous system,CNS)脱髓鞘疾病、僵人综合征(stiffperson syndrome,SPS)、免疫介导性周围神经病、自身免疫性小脑共济失调、肌无力综合征等。自身抗体在神经系统自身免疫疾病,尤其是自身免疫性脑炎和CNS炎性脱髓鞘疾病的诊断与鉴别诊断中起着非常重要的作用。

[0003] 目前,虽然在自身免疫性脑炎患者中识别自身抗体介导的免疫机制方面取得了进展,但仍有一部分表现出脑炎症状的患者血清学检测结果为阴性,因此,寻找并鉴定新的脑炎自身抗体,提高现有的诊断和治疗水平,仍是一项艰巨的任务。

[0004] 胰岛素降解酶(insulin-degrading enzyme,IDE),主要定位于细胞质,但在某些细胞类型中定位于细胞膜、过氧化物酶体和线粒体或分泌于细胞外。胰岛素是一种对葡萄糖稳态至关重要的激素,IDE作为胰岛素水平调节剂,在不破坏链接胰岛素A链和B链的二硫键的情况下,可显著降解细胞内胰岛素,从而终止胰岛素活性。IDE还可降解具有多种生理和病理功能的多种蛋白质,如 $\beta$ -淀粉样蛋白(A $\beta$ )、胰高血糖素、胰岛淀粉样多肽(IAPP)和胰岛素样生长因子等多种肽并参与细胞间肽信号传导,具有广泛的底物混杂性。其中, $\beta$ -淀粉样蛋白(A $\beta$ )可导致脑内老年斑的形成和神经细胞的凋亡,而阿尔兹海默症的特征是大脑中存在具有神经毒性的A $\beta$ 沉积物,A $\beta$ 的产生和沉积是影响阿尔茨海默病(AD)进展和预后的重要因素。IDE还发挥其他非蛋白水解功能,例如:伴侣/死端伴侣、E1-泛素激活酶和蛋白酶体调节剂。它还作为热休克蛋白起反应,调节细胞蛋白质稳态。目前,针对抗IDE自身抗体在神经系统自身免疫疾病患者中的存在情况未见报道。

### 发明内容

[0005] 本发明的目的在于提供检测抗IDE自身抗体的试剂在检测和/或诊断神经系统自身免疫疾病中的应用,特异性检测和/或诊断神经系统自身免疫疾病,提高神经系统自身免疫疾病的诊断的准确性,尤其是实现神经系统自身免疫疾病的辅助诊断。

[0006] 本发明提供了检测抗IDE自身抗体的试剂在制备检测和/或诊断神经系统自身免疫疾病的产品中的应用。

[0007] 优选的,所述检测抗IDE自身抗体的试剂包括IDE蛋白、IDE蛋白的同系物、IDE蛋白

的衍生物、表达IDE蛋白的细胞、表达IDE蛋白的组织和IDE蛋白的裂解物中的一种或多种。

[0008] 优选的,所述IDE蛋白的氨基酸序列包括a) ~ c)中的任意一种:

[0009] a) SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列;

[0010] b) SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列的10% ~ 80%,并且可以识别抗IDE自身抗体的氨基酸序列;

[0011] c) a) 或 b) 中的氨基酸序列经修饰或突变后,并且可以识别抗IDE自身抗体的氨基酸序列。

[0012] 优选的,所述修饰包括糖基化修饰、磷酸化修饰、乙酰化修饰、甲基化修饰和泛素化修饰中的一种或多种。

[0013] 优选的,编码所述IDE蛋白的氨基酸序列的核苷酸序列包括I) ~ III)中的任意一种:

[0014] I) SEQ ID NO.3所示的核苷酸序列;

[0015] II) SEQ ID NO.3所示的核苷酸序列的10% ~ 80%,并且编码的氨基酸序列可识别抗IDE自身抗体;

[0016] III) I) 或 II) 中的核苷酸序列经修饰或突变后,编码的氨基酸序列可识别抗IDE自身抗体。

[0017] 优选的,所述神经系统自身免疫疾病的症状包括头痛,发烧,肌肉酸疼,呕吐,失眠,打鼾,步态异常,记忆下降,吞咽困难,精神异常,癫痫发作,出现认知功能障碍,语言障碍,意识障碍和运动障碍中的一种或多种。

[0018] 优选的,所述神经系统自身免疫疾病的症状包括头痛,发烧,肌肉酸疼,呕吐,失眠,打鼾,步态异常,记忆下降,吞咽困难,精神异常,癫痫发作,认知功能障碍,语言障碍,意识障碍和运动障碍中的一种或多种。

[0019] 优选的,所述神经系统自身免疫疾病为自身免疫性脑炎。

[0020] 本发明还提供了一种检测和/或诊断神经系统自身免疫疾病的试剂盒,包括检测抗IDE自身抗体的试剂和标记抗体。

[0021] 优选的,所述检测抗IDE自身抗体的试剂包括IDE蛋白、表达IDE蛋白的细胞、表达IDE蛋白的组织和含IDE蛋白的裂解物中的一种或多种。

[0022] 优选的,所述IDE蛋白的氨基酸序列包括a) ~ c)中的任意一种:

[0023] a) SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列;

[0024] b) SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列的10% ~ 80%,并且可以识别抗IDE自身抗体的氨基酸序列;

[0025] c) a) 或 b) 中的氨基酸序列经修饰或突变后,并且可以识别抗IDE自身抗体的氨基酸序列。

[0026] 有益效果

[0027] 本发明用患有神经系统自身免疫疾病的患者血清和健康人血清孵育大鼠脑组织切片,通过荧光二抗放大信号,并与神经元特异性Marker抗体共染的方式,发现相比健康人血清,患者血清中存在自身抗体,通过免疫共沉淀及质谱鉴定方式筛选出患者血清上的信号为识别IDE抗原的自身抗体,通过血清中和实验验证目标抗原真实性,并且通过将患者血清与过表达目标抗原细胞孵育并对血清有效抗体成分进行回收的方式,制备含IDE自身抗

体的实验洗脱抗体和不含IDE自身抗体的对照洗脱抗体,孵育过表达细胞爬片、大鼠脑组织切片及细胞毒性实验验证了目标抗原的真实性和特异性,表明IDE蛋白在鼠脑组织、大鼠神经元中均表达且出现明显的信号,IDE可作为神经系统自身免疫疾病相关自身抗体的识别抗原之一,检测抗IDE自身抗体的试剂能够实现神经系统自身免疫疾病的检测和/或诊断,尤其是能实现神经系统自身免疫疾病的辅助诊断。

[0028] 本发明还提供了一种检测和/或诊断神经系统自身免疫疾病的试剂盒,包括检测抗IDE自身抗体的试剂和标记抗体。本发明首次以检测抗IDE自身抗体的试剂为主要成分,建立检测和/或诊断神经系统自身免疫疾病的试剂盒。利用本发明试剂盒能够定性或定量分析抗IDE自身抗体,操作简便,实现神经系统自身免疫疾病的检测和/或诊断,尤其是实现神经系统自身免疫疾病的辅助诊断。

### 附图说明

[0029] 为了更清楚地说明本发明实施例或现有技术中的技术方案,下面将对实施例中所需要使用的附图作简单地介绍。

[0030] 图1为实施例1患者1血清和正常对照血清在大鼠脑组织切片上的染色结果;

[0031] 图2为实施例1患者1血清和Neun抗体在大鼠脑组织切片上的共染结果;

[0032] 图3为实施例2患者1血清与正常对照血清免疫沉淀结果;

[0033] 图4为实施例2患者1血清与正常对照血清免疫沉淀物的Western Blot结果;

[0034] 图5为实施例3中IDE商业抗体在过表达细胞和大鼠脑组织中的Western Blot结果;

[0035] 图6为患者1中和血清在过表达细胞上的染色结果;

[0036] 图7为实施例4患者1中和血清在过表达IDE蛋白上的Western Blot结果;

[0037] 图8为实施例5患者1血清回收抗体在过表达细胞上的染色结果;

[0038] 图9为实施例5患者1血清回收抗体在过表达IDE蛋白和大鼠脑组织蛋白上的Western Blot结果;

[0039] 图10为实施例6患者1血清与IDE抗体在过表达细胞爬片上的共染结果图;

[0040] 图11为实施例6筛选出的3例抗IDE自身抗体检测阳性患者图。

### 具体实施方式

[0041] 本发明提供了检测抗IDE自身抗体的试剂在制备诊断神经系统自身免疫疾病的产品中的应用。

[0042] 在本发明中,所述检测抗IDE自身抗体的试剂优选包括IDE蛋白、表达IDE蛋白的细胞、表达IDE蛋白的组织或含IDE蛋白的裂解物中的一种或多种,进一步优选为IDE蛋白。本发明所述IDE蛋白的氨基酸序列优选包括a)~c)中的任意一种:a)SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列;b)SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列的10%~80%,并且可以识别抗IDE自身抗体的氨基酸序列;c)a)或b)中的氨基酸序列经修饰或突变后,并且可以识别抗IDE自身抗体的氨基酸序列,进一步如SEQ ID NO.2所示。

[0043] 在本发明中,编码所述IDE蛋白的核苷酸序列优选包括I)~III)中的任意一种:I)SEQ ID NO.3所示的核苷酸序列;II)SEQ ID NO.3所示的核苷酸序列的10%~80%,并且编

码的氨基酸序列可识别抗IDE自身抗体；Ⅲ) I) 或 II) 中的核苷酸序列经修饰或突变后, 编码的氨基酸序列可识别抗IDE自身抗体。

[0044] 在本发明中, 所述修饰优选包括糖基化修饰、磷酸化修饰、乙酰化修饰、甲基化修饰和泛素化修饰中的一种或多种。

[0045] 本发明SEQ ID NO.1~3的具体序列如下:

[0046] SEQ ID NO.1: MRYRLAWLLHPALPSTFRSVLGARLPPPERLCGFQKKTYSKM NNPAIKRIGNHIT KSPEDKREYRGLELANGIKVLLISDPTTDKSSAALDVHIGSLSDPPNIAGLSHFCEHMLFLGTTKYPKENEYSQFL SEHAGSSNAFTSGEHTNYYFDVSHEHLEGALDRFAQFFLCPLFDESCKDREVNAVDSEHEKVMNDARLWFQLEKA TGNPKHPFSKFGTGNKYTLTRPNQEGIDVRQELLKFHSAYYSSNLMAVCVLGRESLDDLNLVVKLFSEVENKNV PLPEFPEHPFQEEHLKQLYKIVPIKDIRNLYVTFPIPDLQKYYKSNPGHYLGHLIGHEGPGSLLSELKSKGWNTL VGGQKEGARGFMFFIINVDLTEEGLLHVEDIILHMFQYIQKLRAEGPQEWVFQECKDLNAVAFRFKDKERPRGYT SKIAGILHYYPLEEVLTAEYLLLEFRPDLIEMVLDKLRPENVRVAIVSKSFEGKTDRTEEWYGTQYKQEAIPDEVI KKWQNADLNGKFKLPTKNEFIPTNFEILPLEKEATPYPALIKDTAMSKLWFKQDDKFFLPKACLNFEFFSPFAYVD PLHCNMAYLYLELLKDSLNEYAYAAELAGLSYDLQNTIYGYLSVKGYNDKQPILLKKIIEKMATFEIDEKRFEI KEAYMRSLLNFRAEQPHQHAMYLRLLMTEVAWTKDELKEALDDVTLPRKAFIPQLLSRLHIEALLHGNTKQAA LGIMQMVEDTLIEHAHTKPLLPSQLVRYREVQLPDRGWFVYQQRNEVHNNCGIEIYYQTDQMSTENMFLELFCQI ISEPCFNTLRTKEQLGYIVFSGPRRANGIQGLRFIIQSEKPPHYLESRVEAFLITMEKSIEDMTEEFQKHIQALA IRRLDKPKKLSAECAKYWGEIISQQYNFDRDNTAVAYLKTTLTKEDIKFKYKEMLAVDAPRRHKVSVHVLAREMDSC PVVGEFPCQNDINLSQAPALPQPEVIQNMTEFKRGLPLFPLVKPHINFMAAKL。

[0047] SEQ ID NO.2: MRYRLAWLLHPALPSTFRSVLGARLPPPERLCGFQKKTYSKM NNPAIKRIGNHIT KSPEDKREYRGLELANGIKVLLISDPTTDKSSAALDVHIGSLSDPPNIAGLSHFCEHMLFLGTTKYPKENEYSQFL SEHAGSSNAFTSGEHTNYYFDVSHEHLEGALDRFAQFFLCPLFDESCKDREVNAVDSEHEKVMNDARLWFQLEKA TGNPKHPFSKFGTGNKYTLTRPNQEGIDVRQELLKFHSAYYSSNLMAVCVLGRESLDDLNLVVKLFSEVENKNV PLPEFPEHPFQEEHLKQLYKIVPIKDIRNLYVTFPIPDLQKYYKSNPGHYLGHLIGHEGPGSLLSELKSKGWNTL VGGQKEGARGFMFFIINVDLTEEGLLHVEDIILHMFQYIQKLRAEGPQEWVFQECKDLNAVAFRFKDKERPRGYTS KIAGILHYYPLEEVLTAEYLLLEFRPDLIEMVLDKLRPENVRVAIVSKSFEGKTDRTEEWYGTQYKQEAIPDEVIK KWNADLNGKFKLPTKNEFIPTNFEILPLEKEATPYPALIKDTAMSKLWFKQDDKFFLPKLDLNEYAYAAELAG LSYDLQNTIYGYLSVKGYNDKQPILLKKIIEKMATFEIDEKRFEI KEAYMRSLLNFRAEQPHQHAMYLRLLMTEVAWTKDELKEALDDVTLPRKAFIPQLLSRLHIEALLHGNTKQAA LGIMQMVEDTLIEHAHTKPLLPSQLVRYREVQLPDRGWFVYQQRNEVHNNCGIEIYYQTDQMSTENMFLELFCQI ISEPCFNTLRTKEQLGYIVFSGPRRANGIQGLRFIIQSEKPPHYLESRVEAFLITMEKSIEDMTEEFQKHIQALA IRRLDKPKKLSAECAKYWGEIISQQYNFDRDNTAVAYLKTTLTKEDIKFKYKEMLAVDAPRRHKVSVHVLAREMDSC PVVGEFPCQNDINLSQAPALPQPEVIQNMTEFKRGLPLFPLVKPHINFMAAKL。

[0048] 其中, SEQ ID NO.1和SEQ ID NO.2中加粗部分为差异的氨基酸残基。

[0049] SEQ ID NO.3: 5'-atgcggtaccggctagcgtggcttctgcaccccgactgcccagcaccttccg ctcagtccctcgggcggcctgcccgcctccggagcgcctgtgtggtttccaaaaaagacttacagcaaatgaa taatccagccatcaagagaataggaaatcacattaccaagtctcctgaagacaagcgagaatatcgagggctagag ctggccaatggtatcaaagtacttcttatcagtgatccaccacggataagtcacagcagcacttgatgtgcaca taggttcattgtcggatcctccaaatattgctggcttaagtcatttttgtgaacatatgcttttttgggaacaaa

gaaataccctaaagaaaatgaatacagccagtttctcagtgagcatgcaggaagtcaaatgcctttactagtggagagcataccaattactatTTTTgatgTTTTctcatgaacacctagaaggtgccctagacaggttgcacagtttttctgtgcccccttgttcgatgaaagttgcaaagacagagaggtgaatgcagttgattcagaacatgagaagaatgtgatgaatgatgcctggagactctttcaattggaaaaagctacagggaaatcctaaacacccttcagtaaatttgggacaggtaacaaatatactctggagactagaccaaccaagaaggcattgatgtaagacaagagctactgaaattccattctgcttactattcatccaacttaatggctgtttgtgttttaggtcgagaatctttagatgacttgactaatctgggtggtaaagttatTTTTctgaagtagagaacaaaatgttccattgccagaatttctgaacaccctttccaagaagaa catcttaacaactttacaaaatagtaccattaaagatattaggaatctctatgtgacatttcccatacctgacc ttcagaaatactacaaaacaaatctggtcattatcttggtcattctcattgggcatgaaggctctggaagtctggt atcagaacttaagtaaaagggctgggttaatactcttgttgggtgggcagaaggaaggagcccgaggttttatgttt tttatcattaatgtggacttgaccgaggaaggattattacatggtgaagataataatTTTgcacatgTTTcaataca ttcagaagttacgtgcagaaggacctcaagaatgggttttccaagagtgaaggacttgaatgctggtgcttttag gtttaagacaaaagagaggccacggggctatacatctaagattgcaggaatattgcattattatcccctagaagag gtgctcacagcggaaatattactggaagaatttagacctgacttaatagagatggttctcgataaactcagaccag aaaatgtccgggttgccatagtttctaaatcttttgaaggaaaaactgatcgcacagaagagtggtatggaacca gtacaaacaagaagctataccggatgaagtcatacaagaatggcaaaatgctgacctgaatgggaaatttaactt cctacaaagaatgaatttatctctacgaattttgagattttaccgtagaaaaagaggcgacaccataccctgctc ttattaaggatacagctatgagcaaacTTTggttcaacaagatgataagtttttttggcgaaggcttgctctcaa ctttgaatttttcagcccatttgcttatgtggacccttgcaactgtaacatggcctatttgtaccttgagctcctc aaagactcactcaacgagatgcatatgcagcagagctagcaggcttgagctatgatctccaaaataccatctatg ggatgtatctttcagtgaaaggttacaatgacaagcagccaattttactaaagaagattattgagaaaatggctac ctttgagattgatgaaaaagatttgaattatcaagaagcatatatgcgatctcttaacaatttccgggctgaa cagcctcaccagcatgccaatgactacctccgcttgctgatgactgaagtggcctggactaaagatgagttaaaag aagctctggatgatgtaacccttctcgccttaaggccttcatacctcagctcctgtcacggctgcacattgaagc ccttctccatggaacatacaaaagcaggctgcatttaggaattatgcagatgggtgaagacaccctcattgaacat gctcatacacaacctctccttccaagtcagctggttcggatagagaagttcagctcctgacagaggatggtttg tttatcagcagagaaatgaagttcacaataactgtggcatcgagatatactaccaaacagacatgcaaagcacctc agagaatattgttctggagctcttctgtcagattatctcggaaccttgcttcaacaccctgcgcaccaaggagcag ttgggctatatcgtcttcagcgggcccagctcagctaatggcatacagggttgagattcatcatccagtcagaaa agccacctcactacctagaaaagcagagtggaagcttttctaattaccatgaaaaagtcataagaggacatgacaga agaggccttccaaaaacacattcaggcattagcaattcgtcagctagacaaaacaaagaagctatctgctgagtggt gctaaatactggggagaaatcatctcccagcaatataatTTTgacagagataaacactgaggttgcatatttaagaa cacttaccagaagaagatcatcaattctacaaggaaatgttggcagtagatgctccaaggagacataaggtatc cgtccatgTTTcttgccag ggaatggattcttgtcctgTTTggttgagagttcccatgtcaaatgacataaattt gtcacaagcaccagccttgccacaacctgaagtgattcagaacatgaccgaattcaagcgtggctctgccactgttt cccttgtgaaaccacatattaacttcatggctgcaaaactctga-3'。

[0050] 在本发明中,所述神经系统自身免疫疾病的症状优选包括头痛,发烧,肌肉酸疼, 呕吐,失眠,打鼾,步态异常,记忆下降,吞咽困难,精神异常,癫痫发作,出现认知功能障碍, 语言障碍,意识障碍和运动障碍中的一种或多种;所述神经系统自身免疫疾病优选为自身

免疫性脑炎。本发明所述产品优选包括试剂盒。本发明所述诊断优选为辅助诊断。

[0051] 本发明抗IDE自身抗体与神经系统自身免疫疾病密切相关,能够区分神经系统自身免疫疾病和其它自身免疫疾病,抗IDE自身抗体为神经系统自身免疫疾病的诊断提供了依据。本发明以抗IDE自身抗体为标志物,通过检测抗IDE自身抗体,根据检测结果,医生可结合患者的临床症状、生理生化检测指标、疾病标志物检测结果等综合情况,判断患者是否患有本发明所描述的神经系统自身免疫性相关疾病或排除患有另一种神经系统自身免疫性疾病的可能,有助于医生为患者选择一个较有希望的治疗方案或治疗药物。

[0052] 本发明还提供了一种诊断神经系统自身免疫疾病的试剂盒,包括检测抗IDE自身抗体的试剂和标记抗体。

[0053] 本发明所述检测抗IDE自身抗体的试剂的相关内容已在上文记载,在此不做赘述。本发明所述试剂盒优选还包括FITC标记的羊抗人IgG抗体、反应缓冲液、阳性对照、阴性对照和样品稀释液中的一种或多种。本发明所述阳性对照优选包括可与过表达IDE细胞爬片特异结合的血清或抗体;所述反应缓冲液优选包括含有表面活性剂的磷酸盐,进一步优选为PBST溶液;所述样品稀释液优选包括含有表面活性剂的磷酸盐,进一步优选为PBST溶液。

[0054] 本发明以检测抗IDE自身抗体的试剂为主要成分,建立检测和/或诊断神经系统自身免疫疾病的试剂盒,能够定性或定量分析抗IDE自身抗体,从而检测和/或诊断神经系统自身免疫疾病,尤其具有辅助诊断作用。本发明利用所述试剂盒进行检测时,对采用的检测方式没有严格要求,采用本发明熟知的方式即可,例如CBA、TBA、ELISA、免疫胶体金法、免疫印迹、免疫斑点、膜条法、化学发光、放射免疫法、液相芯片法、侧向层析或流式细胞。

[0055] 为了进一步说明本发明,下面结合附图和实施例对本发明提供的抗IDE自身抗体在制备检测和/或诊断神经系统自身免疫疾病的产品中的应用进行详细地描述,但不能将它们理解为对本发明保护范围的限定。

[0056] 本发明实施例中的患者血清均为医院赠予,已经经过本人同意,健康受试者血清来自于医院体检中心赠送的健康体检者血清,已经过体检者本人同意,以其中一个患者样本进行的实验为例,对抗IDE自身抗体的发现过程进行详细描述,该患者信息如下:

[0057] 患者1:性别女,56岁,半年前无明显诱因出现持续性头昏,伴视物旋转,行走不稳,近期出现发烧,神志恍惚,精神差,言语不清,并伴有近事记忆下降,遂前来就医。入院经查体,血、尿、便常规与肝、肾功能大致正常,血沉、超敏C反应蛋白、甲状腺功能正常,腰椎穿刺压力正常,脑脊液白细胞数轻度升高;无药物、毒物接触史,配偶及子女配偶均体健,父母去世,原因不详,有高血压病家族史。医生怀疑其患有其他自身免疫性疾病,将其样本送往检验科,脑脊液及血清中NMDAR、LGI1、AMPA1、LGI1、GABAR、DPPX、Ri、Yo、Hu、amphiphysin、CV2、AQP4、MBP、MOG、GFAP抗体均阴性。

[0058] 实施例1

[0059] 间接免疫荧光法筛查患者血清

[0060] 1. 制备大鼠脑组织冰冻爬片:

[0061] 选取成年大鼠进行麻醉,待老鼠四肢硬化后打开腹腔,暴露出心尖,从左心尖灌注PBS,以便全身循环;然后取出脑组织,甲醇固定10~30min;将样本移入30wt.%蔗糖溶液中进行脱水,4℃放置至组织块沉底;将少量包埋剂OCT滴加到标本台,置入-20℃冷冻切片机(厂家:LEICA型号:CM1950)的冷冻台,待组织略微发白时用OCT在标本表面涂一薄层,继续



冷冻20min,切片获得大鼠脑组织冰冻爬片。

[0062] 2.血清孵育:

[0063] 使用PBST将患者1和正常对照血清分别按1:10进行稀释,分别孵育至大鼠脑组织冰冻切片上,室温孵育1h,PBST洗3次,每次5min;加入稀释好的FITC标记的羊抗人二抗(厂家:Jackson货号:109-095-170),室温孵育30min,PBST洗3次,每次5min,荧光显微镜下观察,发现患者1血清在大鼠脑组织冰冻切片上海马部位出现阳性信号,正常对照血清在此部位未出现阳性信号(图1)。

[0064] 3.抗体共染

[0065] 使用神经元特异性markerNeuN抗体(厂家:武汉三鹰货号:26975-1-AP)对步骤2孵育过患者1血清的爬片进行抗体共染,NeuN抗体1:200稀释,PBST洗3次,每次5min;AlexaFluor 594标记的羊抗兔IgG(厂家:Jackson货号:115-585-144)室温孵育30min,PBST洗3次,每次5min;DAPI对细胞核进行染色,室温染色10min,PBST洗3次,每次5min;显微镜下观察,发现患者1血清染出的信号与NeuN抗体在大鼠脑组织冰冻切片上的信号重叠(图2),表明患者1血清中抗体所识别的抗原存在于神经元细胞上。

[0066] 4.已知神经系统相关自身抗体的靶抗原筛查

[0067] 查找到60种已报道的有关神经系统自身抗体靶抗原(包括DPPX、IgLON5、GlyR、GABAAR $\alpha$ 1、GABAAR  $\gamma$  2、GABAAR $\beta$ 3、mGluR5、D2R、Neurexin-3 $\alpha$ 、AQP4、MBP、MOG、GFAP、AQP1、Flotillin1/2、homer-3、ITPR1、mGluR5、ARHGAP26、KCNA4、ATP1A3、NCDN、Septin-5、NrCAM、Gliomedin、KLHL11、gephyrin、CARP-VIII、TGM2、TGM6、Trib2、TP0、AK5、GRIA3、MUNC18-1、KCTD16、mGluR1、CACNA2D1、RyR1、PLP1、PDE10A、ADAM22、ROCK2、mGluR2、Rab6A、Rab6B、Tg、LRP4、MuSK、MAG、NF155、NF186、CNTN1、CNTN2、CASPR1、mGluR1、PCA2、agrin、MAP1B、NAE),从NCBI上查找编码上述60种蛋白的基因序列并送往测序公司进行基因合成,获得对应基因的重组载体,然后将重组载体转染至293T细胞获得重组细胞,制备成过表达目标抗原的生物检测芯片材料,通过免疫荧光法检测患者血清/脑脊液是否能与该生物检测芯片孵育后发生免疫反应,探索患者血清/脑脊液中是否含有该系列基因的特异性自身抗体,具体步骤如下:

[0068] (1)重组载体构建:通过PCR或人工合成的方法,将上述60种基因分别通过分子克隆方法连至pCDNA3.1上,得到60种重组载体,构建好的重组载体经测序正确后大提备用;

[0069] (2)目的基因转染:使用10%FBS-DMEM高糖培养基于37 $^{\circ}$ C,5%CO<sub>2</sub>细胞培养箱中培养皿底铺有6cm $\times$ 6cm爬片的293T细胞,共计61皿,待细胞密度达到30%~40%时,使用PEI转染试剂(厂家:thermo,货号:BMS1003)将60种对应基因的重组载体和空载pCDNA3.1分别转染至293T细胞中,并进行标记;

[0070] (3)细胞爬片固定:转染后生长48h的细胞用PBS洗涤2次,加入丙酮固定5min,PBS洗涤2次,45 $^{\circ}$ C干燥30min,将爬片裁成2.5mm $\times$ 2.5mm大小,并将61种2.5mm $\times$ 2.5mm的细胞爬片贴在载玻片上,制备成筛选目标抗原的生物检测芯片备用;

[0071] (4)免疫荧光染色:使用PBST将患者1血清和对照血清分别按照1:10的比例稀释后孵育至生物检测芯片上,室温孵育1h,PBST洗3次,每次5min;使用1:200稀释的FITC标记的羊抗人二抗,室温孵育30min,PBST洗3次,每次5min;荧光显微镜下观察发现患者1血清与60种生物检测芯片均未发生信号明显强于对照血清的显色反应,但根据上述大鼠脑组织切片

染色结果可知,患者1血清在神经元海马部位染色结果明显,因此怀疑患者1血清中可能存在不同于以往报道的可识别神经元细胞的新的自身抗体。

#### [0072] 实施例2

##### [0073] 原代细胞裂解物的免疫共沉淀和目的抗原的验证与鉴定

[0074] 1.取6皿大鼠原代神经元细胞,弃上清,PBS洗2遍,0.4wt.%多聚甲醛固定10min,1×HEPES洗3次;使用DMEM将患者1血清和正常对照血清分别1:1000稀释,0.22 $\mu$ m滤膜过滤,分别加入到固定好的原代神经元细胞中,室温孵育2h;取15 $\mu$ L ProteinA/G免疫沉淀磁珠(厂家:Selleck)加入到2mL管子中,平衡液洗3遍,用300 $\mu$ L 4%BSA封闭2h;将孵育好的细胞置于冰上,弃上清,PBS洗2遍,加入500 $\mu$ L裂解液(以水为溶剂,含有150mM NaCl,1mM EDTA,100mM Tris-HCl,0.5%脱氧胆酸钠,1%TritonX-100和0.1%SDS,pH值7.5),收集细胞,加入终浓度为1×的蛋白酶抑制剂,裂解30min,间隔震荡,15000rpm离心30min,取上清,测浓度;将收集的上清加入到处处理好的ProteinA/G免疫沉淀磁珠中,4℃过夜旋转孵育;用上述裂解液清洗孵育的磁珠4次,用80 $\mu$ L 2×loading buffer洗脱,收集洗脱液;洗脱液中先加入5×SDS-PAGE loading buffer,再加入终浓度为0.01M的DTT,100℃加热10min,然后再加入终浓度为质量浓度为2wt.%的碘乙酰胺,室温放置30min,即为患者1血清样本和正常对照血清样本的免疫沉淀复合物;将制备好的免疫复合物进行SDS-PAGE电泳后,使用银染试剂盒(厂家:thermo)进行染色,结果表明,在大鼠神经元中,用患者1血清捕获到的免疫沉淀物中检出一种大约100KD~130KD的蛋白质,该蛋白质不存在于类似方法在正常对照血清制备的对照中(图3)。

##### [0075] 2.免疫印迹验证

[0076] (1)电泳:取步骤1得到的免疫复合物样品进行SDS-PAGE;

[0077] (2)转膜:电泳完成后,使用湿法转膜,转膜条件为200mA,90min;

[0078] (3)封闭:使用5%的脱脂奶粉室温封闭1h;

[0079] (4)血清孵育:使用TBST将患者1血清和正常对照血清分别1:100稀释,室温孵育2h;

[0080] (5)洗涤:TBST洗3次,每次5min;

[0081] (6)二抗孵育:加入HRP标记的羊抗人IgG二抗(厂家:Jackson),室温孵育1h;

[0082] (7)洗涤:TBST洗3次,每次5min;

[0083] (8)显色:结果表明用患者1血清在原代神经元细胞中捕获到的免疫沉淀物中存在与患者1血清中自身抗体反应的条带,目的蛋白带处于100KD~130KD之间,而该免疫沉淀物与正常对照血清在100KD~130KD之间不存在反应性条带(图4),证明患者1血清中存在与神经元蛋白反应的自身抗体。

##### [0084] 3.质谱法鉴定目的抗原

[0085] 切胶回收步骤1在100KD~130KD处条带(图3中箭头位置),送去诺禾致源生物进行质谱法分析,质谱结果显示切下的胶条内含有IDE蛋白(insulin degrading enzyme,登录号:NM\_004969.4)。

#### [0086] 实施例3

[0087] 商业化抗体在大鼠脑组织冰冻切片免疫荧光实验验证目的抗原的表达

[0088] 1.蛋白样品的制备

[0089] 大鼠脑组织各取50mg分别剪碎,转移至研钵中加入液氮冷冻研磨至细腻粉末状,各组样本分别加入500 $\mu$ L RIPA裂解液(由150mMNaCl,1mMEDTA,100mMTris-HCl,0.1%SDS,0.5%脱氧胆酸钠,1%TritonX-100和5%甘油组成,pH值7.5),加入终浓度为1 $\times$ 的蛋白酶抑制剂,超声破碎(破碎条件为:10%功率,破碎3s,停6s,共超声1min)。超声后冰上裂解30min,间隔5min震荡一次;另取1皿过表达IDE的293T细胞和1皿空载pCDNA3.1细胞进行收集,分别加入200 $\mu$ L PBS,超声破碎(破碎条件同组织蛋白),将所有样品收集后15000rpm离心30min,取上清用BCA法测定蛋白浓度;

[0090] 2. 上样及转膜

[0091] 分别取40 $\mu$ g大鼠全脑组织蛋白、过表达IDE蛋白和pCDNA3.1蛋白进行上样,电泳结束后采用转膜条件为300mA,90min进行湿法转膜;5%的脱脂奶粉室温封闭1h;

[0092] 3. 抗体孵育及显色

[0093] 使用1:1000稀释的IDE商业化抗体(厂家:abcam货号:ab32216)或内参GAPDH抗体(厂家:Jackson)孵育至转膜后的PVDF膜上,4 $^{\circ}$ C孵育过夜;次日,TBST洗3次,每次5min;加入HRP标记的羊抗兔二抗(厂家:Jackson),室温孵育1h;TBST洗3次,每次5min;加入ECL化学发光液显色拍照,结果显示,在过表达IDE细胞和大鼠脑组织中均有IDE蛋白的表达(图5)。

[0094] 实施例4

[0095] 血清中和实验验证患者血清所检信号

[0096] 1. 重组载体的构建

[0097] 通过PCR或人工合成的方法,将IDE基因(SEQ ID NO.3)通过分子克隆方法连至pCDNA3.1上,插入位点为XbaI/NotI,得到重组载体pCDNA3.1-IDE,构建好的重组载体经测序正确后大提备用。

[0098] 2. 中和血清的制备

[0099] (1) 目的基因转染:使用CD05培养基(厂家:奥普迈)于100mL培养瓶中培养293F悬浮细胞20mL,共计2瓶,置于37 $^{\circ}$ C,5%CO<sub>2</sub>细胞培养摇床中。待细胞密度达到3 $\times$ 10<sup>6</sup>/mL时,使用PEI转染试剂(厂家:thermo,货号:BMS1003)将pCDNA3.1-IDE重组载体和空载pCDNA3.1分别转染至293F细胞中,并进行标记,第二天离心换液;

[0100] (2) 细胞固定:转染后生长96h的两瓶悬浮细胞分别离心后用PBS洗涤2次,使用5mL PBS重悬,加入无水乙醇固定10min,离心去乙醇,PBS洗涤2次,置于2mL EP管中加入1mLPBS重悬;

[0101] (3) 血清中和:分别取12 $\mu$ L患者1血清加入到两管固定后的细胞中,4 $^{\circ}$ C孵育过夜,次日离心,孵育过表达IDE悬浮细胞的离心上清标记为中和血清,孵育空载pCDNA3.1悬浮细胞的离心上清标记为对照血清。

[0102] 3. 免疫荧光实验

[0103] 参考实施例1,制备过表达IDE细胞爬片和空载pCDNA3.1对照细胞爬片备用;使用中和血清和对照血清分别孵育过表达IDE细胞爬片和pCDNA3.1对照细胞爬片,室温孵育1h,PBST洗3次,每次5min;加入稀释好的FITC标记的羊抗人二抗(厂家:Jackson货号:109-095-170),室温孵育30min,PBST洗3次,每次5min;显微镜下观察,结果表明,在过表达IDE细胞爬片上,中和血清信号减弱,而对照血清信号依然明显(图6),表明患者1血清被过表达IDE悬浮细胞中和的信号为特异性识别IDE抗原的信号。

#### [0104] 4. Western Blot实验

[0105] 参考实施例3制备蛋白样品,并进行电泳、转膜及封闭步骤,使用中和血清和对照血清分别孵育至转膜后的PVDF膜上,4℃孵育过夜;次日,TBST洗3次,每次5min;加入HRP标记的羊抗人二抗(厂家:Jackson),室温孵育1h;TBST洗3次,每次5min;加入ECL化学发光液显色拍照,结果表明,在过表达IDE蛋白的泳道上,中和血清在100-130KD处条带信号减弱,而对照血清在此处依然有明显条带信号(图7),表明患者1血清被过表达IDE悬浮细胞中和的信号为特异性识别IDE抗原的信号(内参GAPDH抗体孵育方式同实施例3)。

#### [0106] 实施例5

[0107] 回收血清自身抗体验证患者血清所检信号

##### [0108] 1. 回收血清自身抗体的制备

[0109] 将实施例4步骤2中离心收集取中和血清后的两管细胞用PBS重悬,重复洗4次,每次5min;洗涤结束后,每管加入500μL pH=3的0.1M甘氨酸洗脱液,室温旋转摇床洗脱15min,洗脱结束后离心收集洗脱液,向洗脱液中加入10μL 1M的Tris中和至洗脱液pH为7.0~8.0,加入1/10体积的PBS,共得到2份500μL洗脱样品,其中一份是患者1血清与过表达IDE悬浮细胞结合后的实验洗脱抗体;另一份是患者1血清与对照pCDNA3.1悬浮细胞结合后的对照洗脱抗体。

##### [0110] 2. 免疫荧光实验

[0111] 使用实验洗脱抗体和对照洗脱抗体分别孵育过表达IDE细胞爬片和空载pCDNA3.1对照细胞爬片,室温孵育1h,PBST洗3次,每次5min;使用1:200稀释的FITC标记的羊抗人IgG,室温孵育30min,PBST洗3次,每次5min;荧光显微镜下观察,结果表明,与过表达IDE悬浮细胞结合的实验洗脱抗体在过表达IDE细胞爬片上有明显阳性信号,而对照洗脱抗体没有(图8),表明与过表达IDE悬浮细胞结合的实验洗脱抗体可特异性识别过表达细胞爬片上的IDE抗原。

#### [0112] 3. Western Blot实验

[0113] 参考实施例3制备蛋白样品,并进行电泳及转膜及封闭步骤,使用实验洗脱抗体和对照洗脱抗体分别孵育至转膜后的PVDF膜上,4℃孵育过夜;次日,TBST洗3次,每次5min;加入HRP标记的羊抗人二抗(厂家:Jackson),室温孵育1h;TBST洗3次,每次5min;加入ECL化学发光液显色拍照,结果表明,实验洗脱抗体在过表达IDE蛋白组泳道,及大鼠脑组织蛋白泳道的100-130KD处有明显条带信号,而对照洗脱抗体条带信号不明显(图9),表明与过表达IDE悬浮细胞结合的实验洗脱抗体可特异性识别过表达细胞中及大鼠脑组织中的IDE抗原(内参GAPDH抗体孵育方式同实施例3)。

#### [0114] 实施例6

[0115] 抗IDE自身抗体在疑似神经系统自身免疫疾病样本的检出率

##### [0116] 1. 免疫荧光染色

[0117] (1) 血清孵育:使用PBST将患者1的血清稀释10倍,分别孵育过表达IDE细胞爬片和空载pCDNA3.1对照细胞爬片,室温孵育1h;PBST洗3次,每次5min;加入FITC标记的羊抗人IgG二抗,室温孵育1h;PBST洗3次,每次5min;

[0118] (2) 抗体共染:使用PBST将商业化IDE抗体1:100稀释后继续孵育上一步的表达IDE细胞爬片和空载pCDNA3.1对照细胞爬片,室温孵育1h;PBST洗3次,每次5min;加入

AlexaFluor594标记的羊抗兔IgG,室温孵育1h;PBST洗3次,每次5min;显微镜下观察,结果表明患者1血清在过表达IDE细胞爬片上出现的染色信号与商业化IDE抗体在过表达IDE细胞爬片上出现的染色信号重叠(图10),表明患者1血清中抗体与过表达IDE细胞爬片上的IDE蛋白特异性识别。

[0119] 2. 选取3890例具有神经系统疾病症状的患者样本(其中血清3328例,脑脊液562例),这些患者表现出的症状有:疑似脑炎、副肿瘤综合征、重症肌无力、视神经脊髓炎、周围神经病,经过已知报道的神经系统自身抗体检测均为阴性结果。使用过表达IDE的细胞爬片和空载pCDNA3.1对照细胞爬片进行检测,共筛选出44例抗IDE自身抗体阳性样本(其中血清阳性42例,脑脊液阳性2例,脑脊滴度为1:1的1例阳性患者,相应其血清也为阳性,滴度为1:10),抗IDE自身抗体的总体检出率为1.13%(其中血清样品检出率1.26%,脑脊液样品检出率0.3%),部分患者染色结果如图11所示,部分患者临床症状如表1所示。经临床医生确诊,检出抗IDE抗体的44例患者患有自免性脑炎,其中2例自免性脑炎患者合并中枢脱髓鞘疾病。本发明为实现自身免疫性脑炎的诊断提供了待测的与自身抗体结合的新抗原,抗IDE自身抗体可在患有神经系统症状的患者中检出,说明该自身抗体对神经系统自身免疫疾病的诊断具有辅助作用。

[0120] 表1部分患者临床信息

患者编号	性别	年龄	样本类型	滴度	临床症状	相关癌症
a	男	65	血清	1:32	失眠,记忆障碍,行为改变,癫痫发作	小细胞肺癌
b	男	41	血清	1:10	发热,肌肉疼痛,步态异常,认知障碍	/
c	女	63	血清	1:32	头痛,呕吐,复视,严重肢体和步态共济失调,记忆力减退	/
d	女	54	血清	1:10	发热,头痛,精神行为异常,认知障碍,近事记忆下降	/
			脑脊液	1:1		
e	女	48	血清	1:100	眩晕,复视,伴有呕吐,癫痫发作,小脑共济失调	/
f	男	57	血清	1:320	语言障碍,运动障碍,意识水平下降与昏迷,自主神经功能障碍	胸腺瘤

[0121] 实施例7

[0122] 基于细胞的免疫荧光法验证抗IDE自身抗体的特异性

[0123] 选取57例(其中anti-NMDAR<sup>+</sup>5例、anti-GABABR<sup>+</sup>3例、anti-CASPR2<sup>+</sup>3例、anti-LGI1<sup>+</sup>2例、anti-AMPA<sup>+</sup>3例、anti-Hu<sup>+</sup>5例、anti-Ri<sup>+</sup>4例、anti-Yo<sup>+</sup>3例、anti-CV2<sup>+</sup>5例、anti-Ma2<sup>+</sup>4例、anti-amphiphysin<sup>+</sup>4例、anti-GAD65<sup>+</sup>5例、anti-AQP4<sup>+</sup>5例、anti-MBP<sup>+</sup>3例、anti-MOG<sup>+</sup>3例)患有神经系统自身免疫疾病的疾病对照样本和40例健康对照样本,使用过表达IDE的细胞爬片进行免疫荧光检测,结果显示,所选取的57例神经系统自身免疫病样本和40例健康对照样本均不与过表达IDE细胞爬片产生类似于实施例6中筛出的44例患者样本相似的细胞形态。

[0124] 实施例8

[0126] IDE突变体检测患者血清中的抗IDE自身抗体

[0127] 选择人IDE基因的1个突变体,即缺失了IDE蛋白的第572-599位氨基酸的突变体(SEQ ID NO.2),按照实施例2记载的步骤进行载体构建、制备过表达重组IDE缺失突变体的细胞爬片以及对患者血清进行检测,结果显示,IDE的缺失突变体仍能识别患者血清中的抗IDE抗体。

[0128] 根据上述实施例可以看出,抗IDE自身抗体可以作为检测和/或诊断神经系统自身免疫疾病的生物标志物,通过检测抗IDE自身抗体能够实现神经系统自身免疫疾病的诊断和筛查,尤其是能够实现神经系统自身免疫疾病的辅助诊断。

[0129] 尽管上述实施例对本发明做出了详尽的描述,但它仅仅是本发明一部分实施例,而不是全部实施例,人们还可以根据本实施例在不经创造性前提下获得其他实施例,这些实施例都属于本发明保护范围。

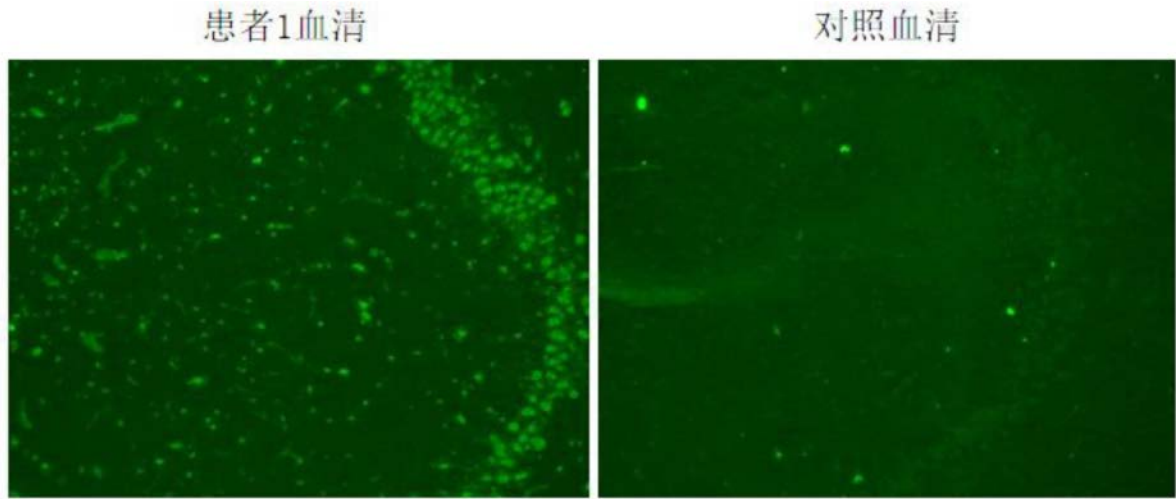


图1

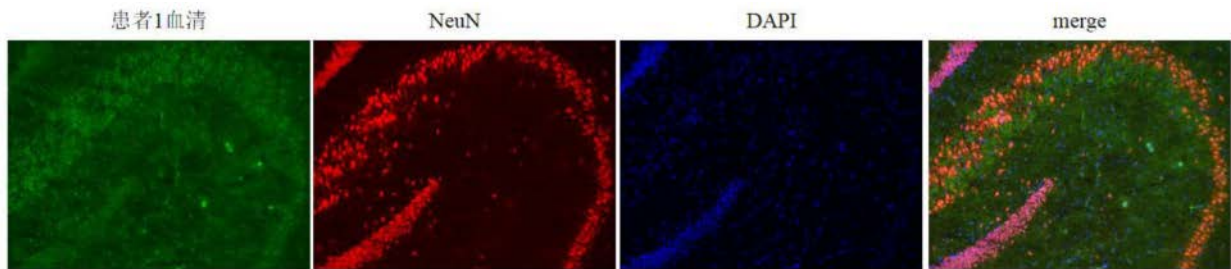


图2

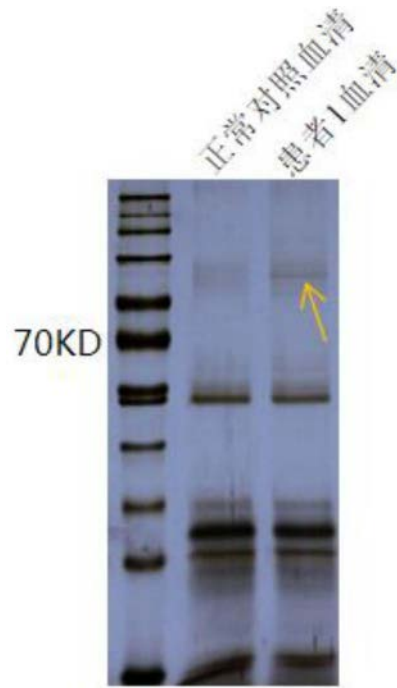


图3

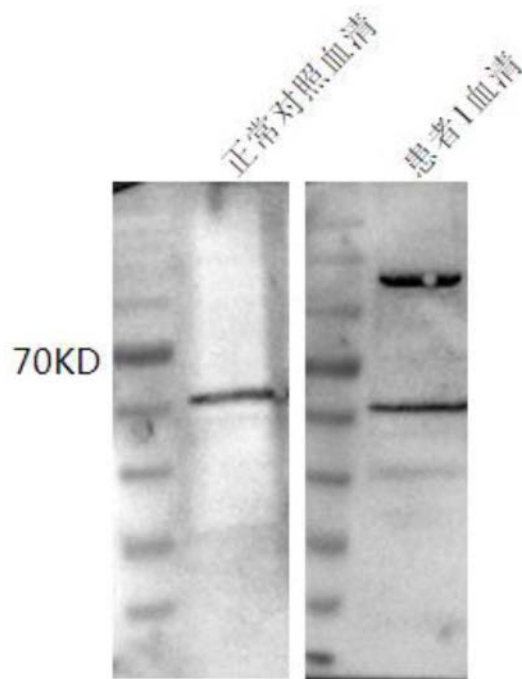


图4



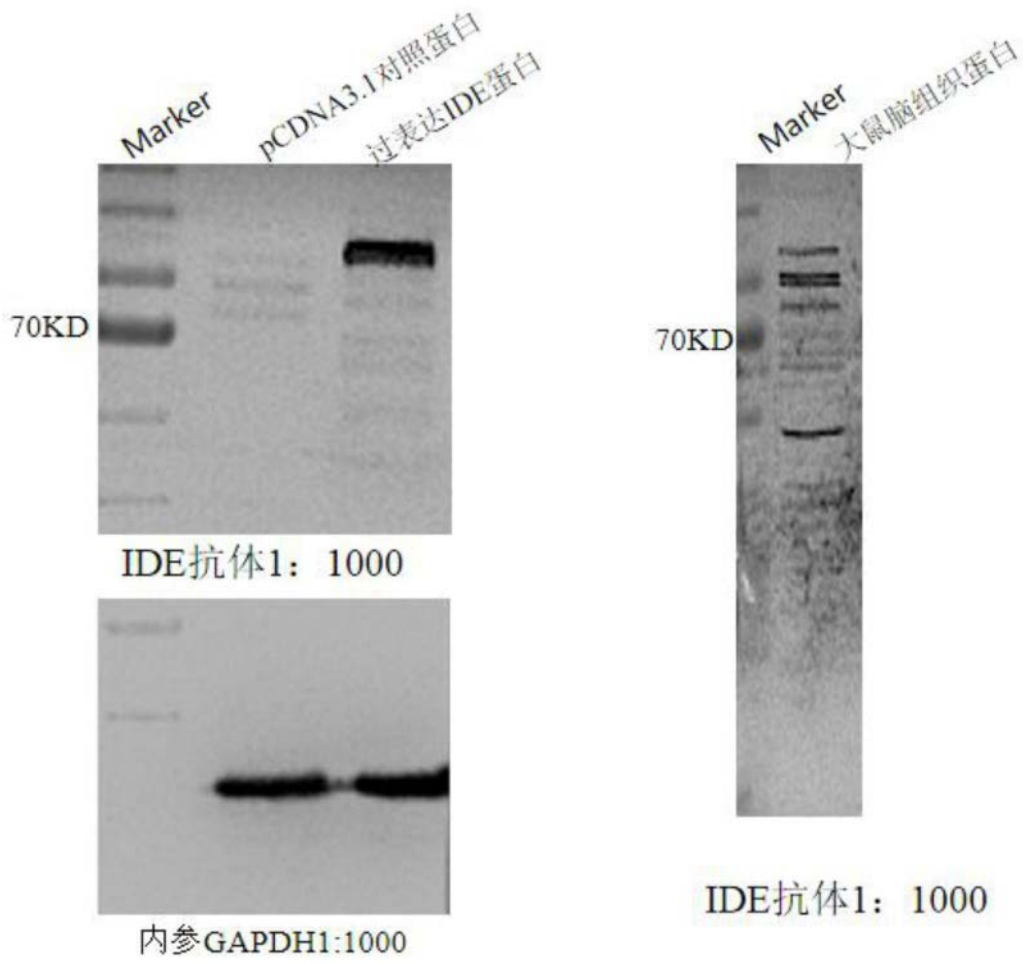


图5

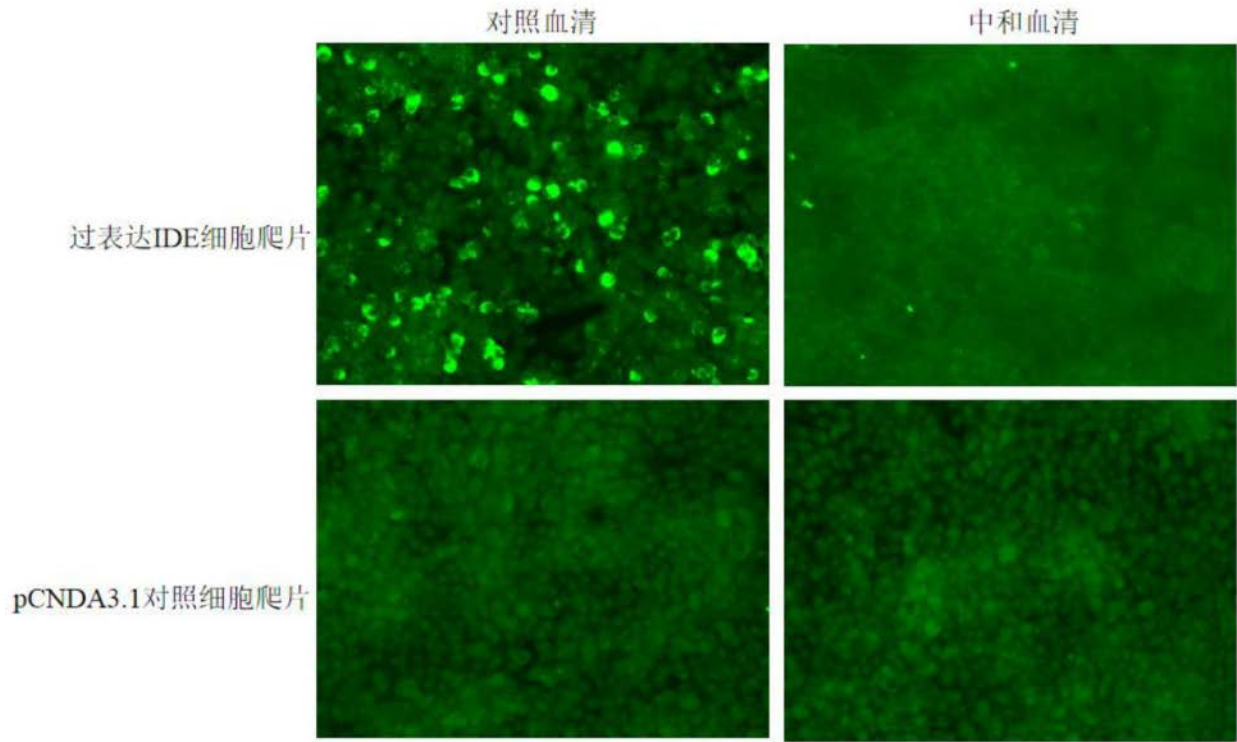


图6

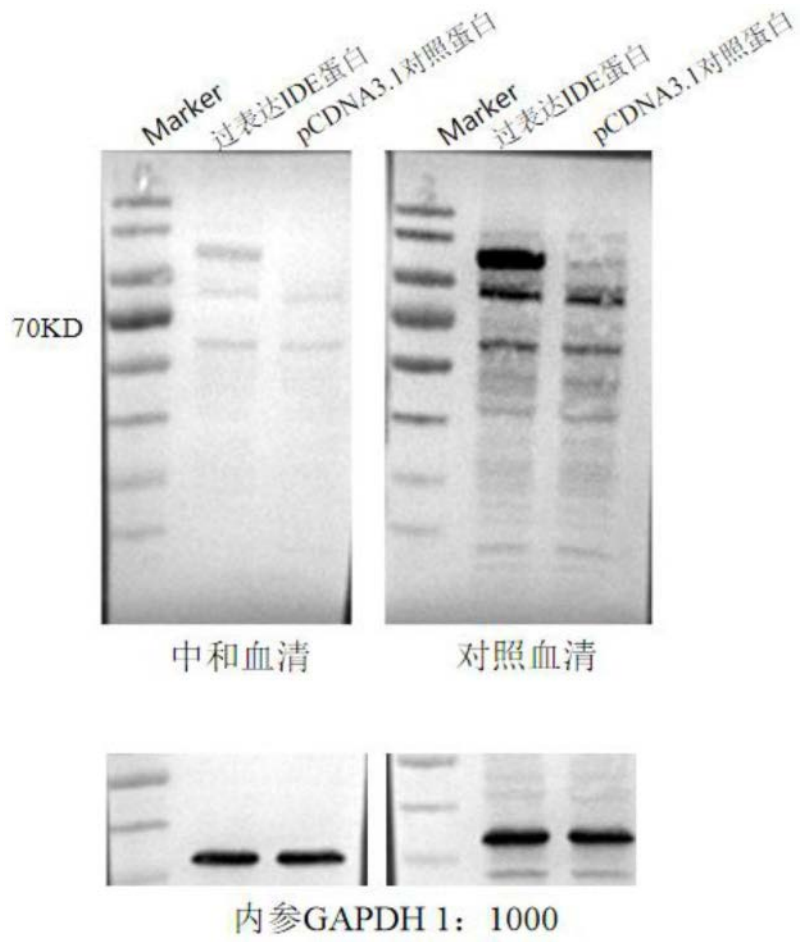


图7

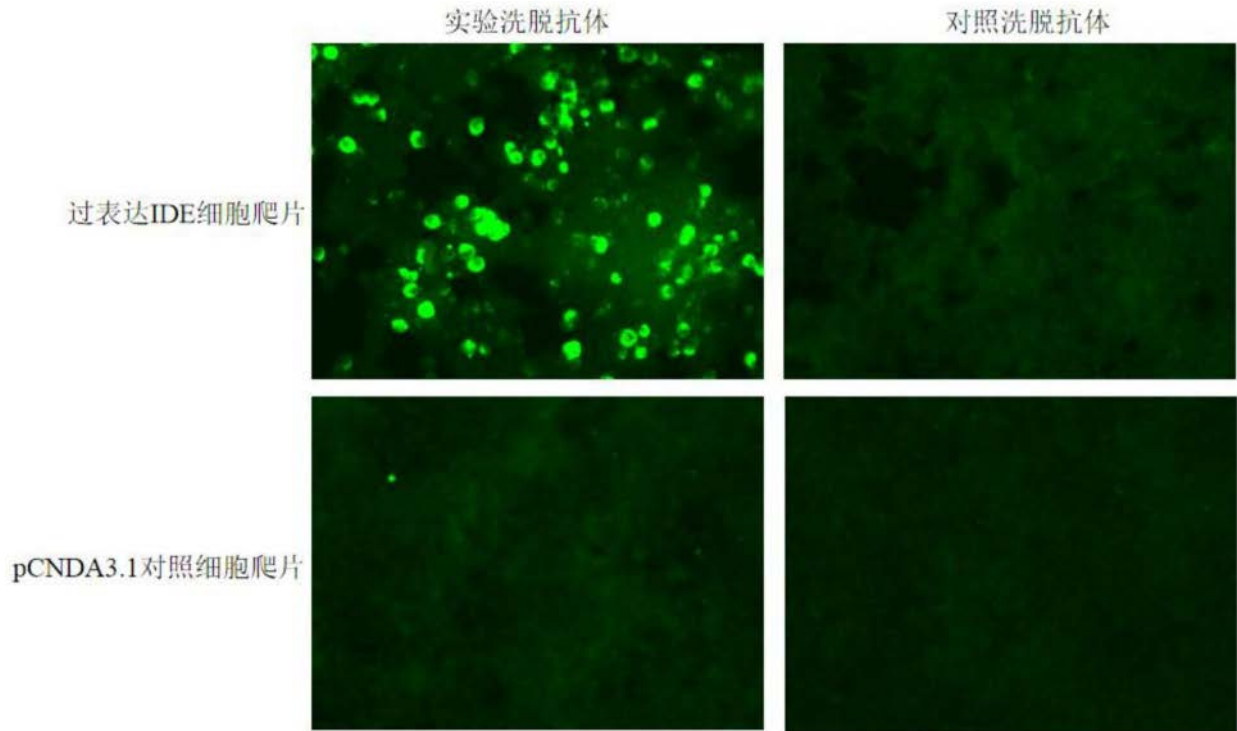


图8

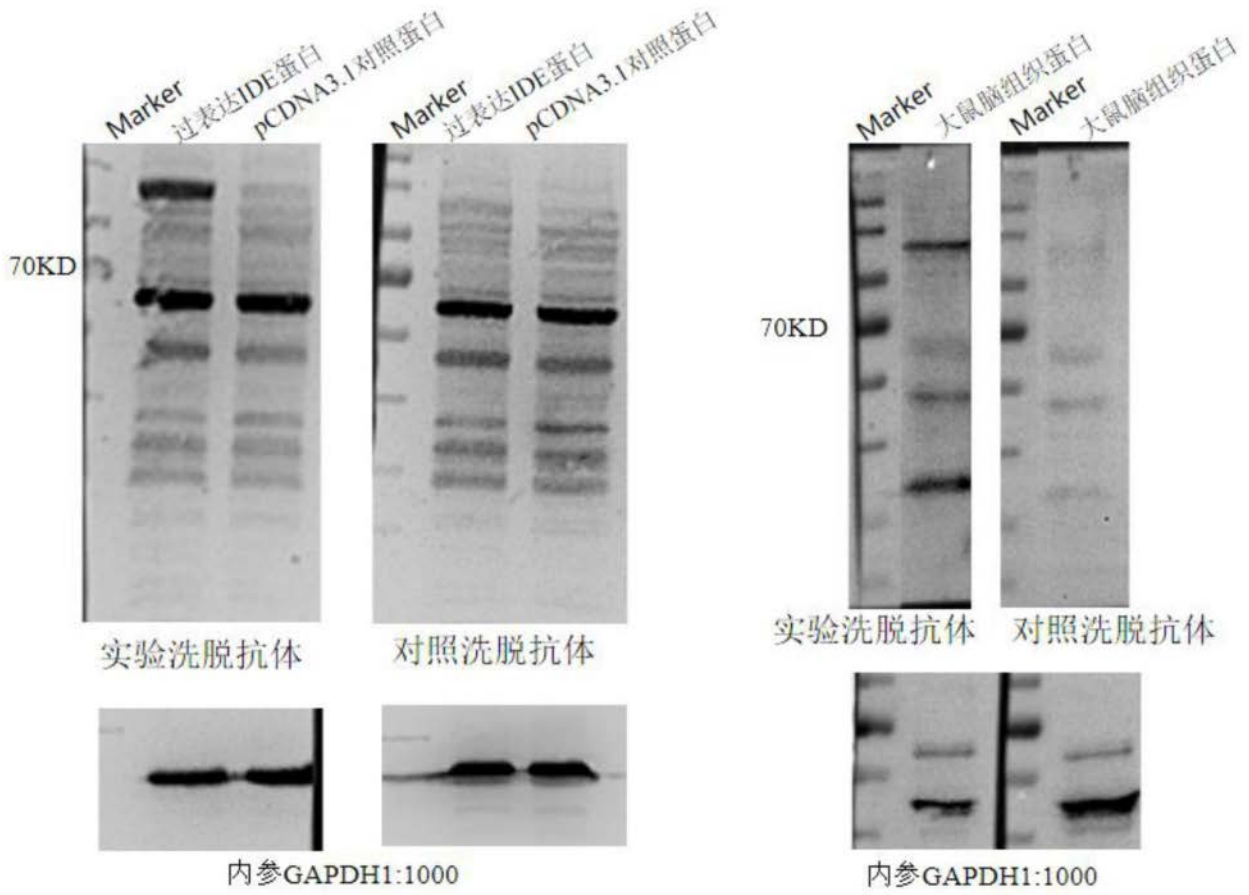


图9

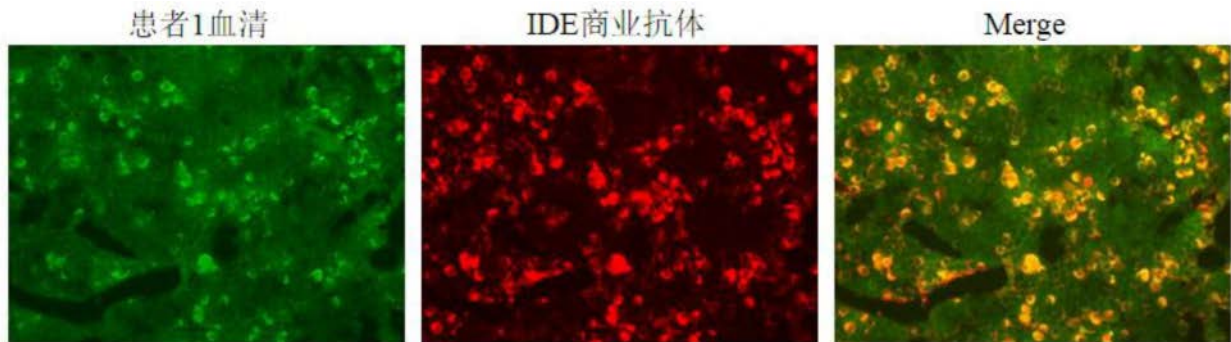


图10

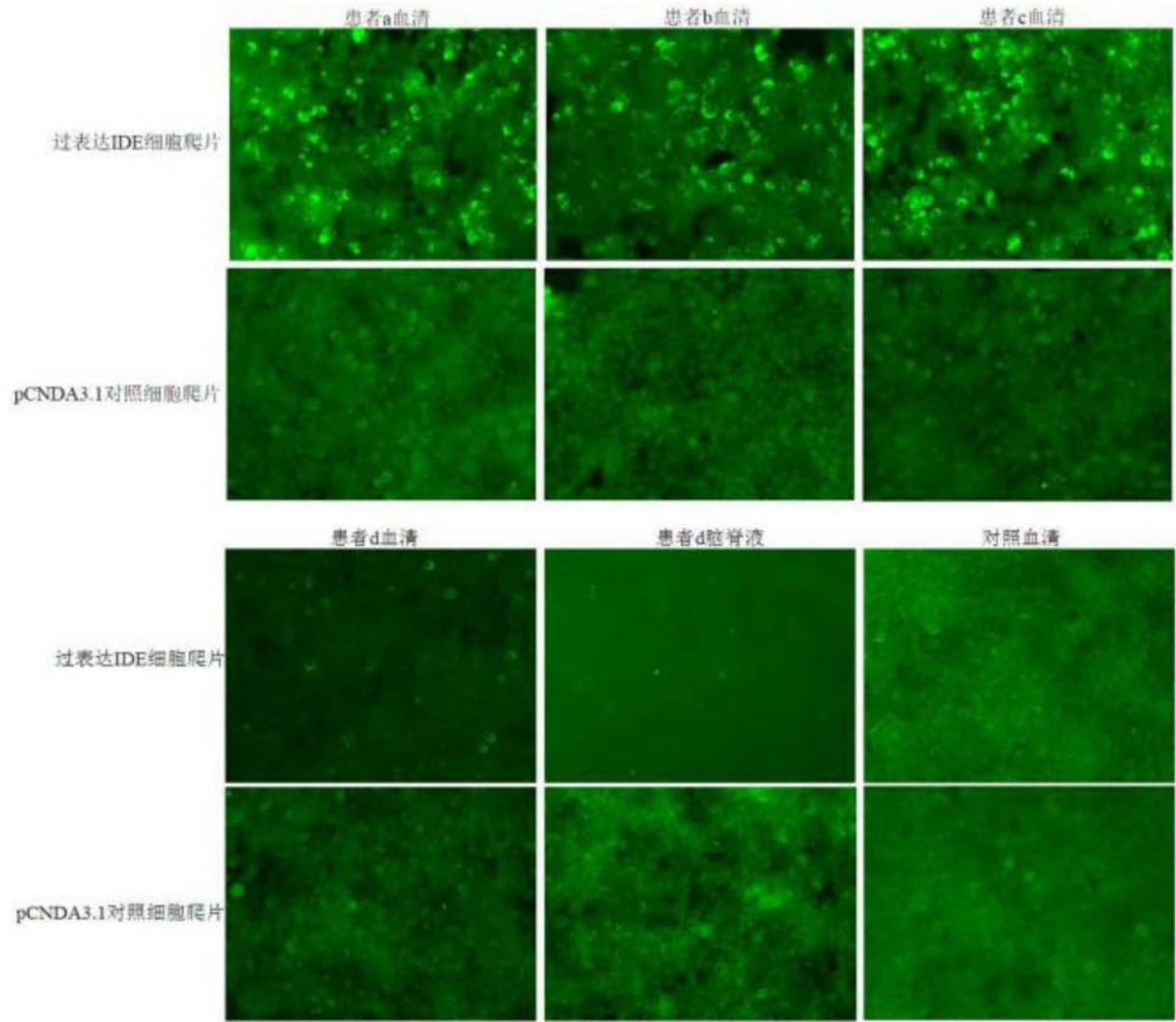


图11