



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107144692 A  
(43)申请公布日 2017.09.08

(21)申请号 201710279994.9

(22)申请日 2017.04.26

(71)申请人 中南大学

地址 410083 湖南省长沙市岳麓山左家垅

(72)发明人 张华莉 杨洋 黄莉 王莉 罗卉

左晓霞 朱红林 刘瑛 王国春

李懿莎 曹航 刘可 刘梅冬

陈广文 肖献忠

(74)专利代理机构 长沙星耀专利事务所(普通合伙) 43205

代理人 宁星耀

(51) Int. Cl.

G01N 33/558(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

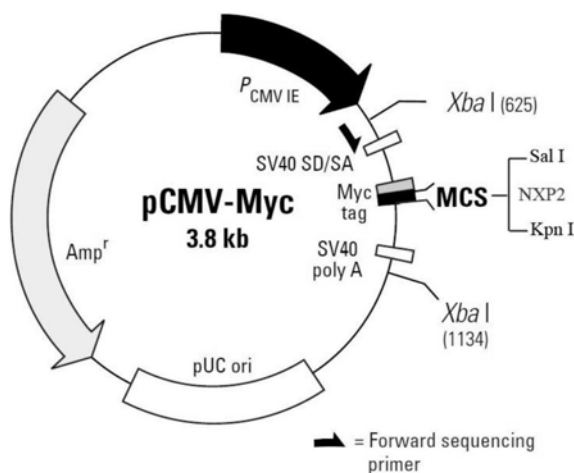
权利要求书1页 说明书5页  
序列表1页 附图4页

(54)发明名称

肌炎特异性自身抗体NXP2抗体的免疫印迹检测方法与应用

(57)摘要

本发明公开了肌炎特异性自身抗体NXP2抗体的免疫印迹检测方法与应用,构建含NXP2 N端(1-500aa)或NXP2 C端(400-939aa)带有Myc标签的质粒pCMV-myc-NXP2N或pCMV-myc-NXP2C,用待测肌炎患者的血清作为一抗、兔抗人IgG H&L作为二抗确定肌炎患者血清中是否具有NXP2自身抗体;解决了目前国内还没有商业化的检测NXP2抗体的ELISA试剂盒以及免疫印迹膜条的问题,以及自行包被NXP2抗原的ELISA试剂盒的高成本、高假阳性率和放射标记免疫沉淀法的安全性等问题。



1. 肌炎特异性自身抗体NXP2抗体的免疫印迹检测方法,其特征在于,包括以下步骤:

(1) 利用引物对NXP2-F/NXP2-R2和引物对NXP2-F2/NXP2-R从pCMV-myc-NXP2全长质粒中分别PCR扩增人NXP2的N端或C端;

(2) 用胶回收试剂盒(Omega, D2500-01)回收纯化步骤(1)所述的NXP2的N端或C端,然后克隆至pCMV-myc载体,构建含NXP2N端或NXP2C端且带有Myc标签的pCMV-myc-NXP2N或pCMV-myc-NXP2C质粒;

(3) 酶切鉴定确定步骤(2)所述pCMV-myc-NXP2N、pCMV-myc-NXP2C质粒的插入子,并测序验证其NXP2N端、NXP2C端序列和读码框的准确性;

(4) 将步骤(3)所述验证后的pCMV-myc-NXP2N或pCMV-myc-NXP2C质粒瞬时转染人胚肾HEK293细胞48小时,通过Western Blot法分别用c-myc抗体、NXP2抗体检测其在HEK293细胞中的过表达;

(5) 将步骤(4)中所述过表达NXP2N端或NXP2C端的HEK293细胞裂解液进行SDS-PAGE凝胶电泳,分别用NXP2抗体阳性的肌炎患者血清和正常人的血清作为一抗、兔抗人IgG H&L作为二抗进行检测,证实NXP2抗体阳性血清能够特异性识别步骤(4)中所述HEK293细胞过表达的带有myc标签的NXP2N端和NXP2C端;

(6) 将步骤(4)中所述过表达NXP2C端的HEK293细胞裂解液进行SDS-PAGE凝胶电泳,用待测肌炎患者血清作为一抗、兔抗人IgG H&L作为二抗进行检测。

2. 根据权利要求1所述的肌炎特异性自身抗体NXP2抗体的免疫印迹检测方法,其特征在于,步骤(1)中所述的引物对NXP2-F/NXP2-R2包括引物NXP2-F和引物NXP2-R2,所述引物NXP2-F的序列如SEQ ID NO:1所示,所述引物NXP2-R2的序列如SEQ ID NO:2所示。

3. 根据权利要求1所述的肌炎特异性自身抗体NXP2抗体的免疫印迹检测方法,其特征在于,步骤(1)中所述引物对NXP2-F2/NXP2-R包括引物NXP2-F2和引物NXP2-R,所述引物NXP2-F2的序列如SEQ ID NO:3所示,所述引物NXP2-R的序列如SEQ ID NO:4所示。

4. 根据权利要求1所述的肌炎特异性自身抗体NXP2抗体的免疫印迹检测方法,其特征在于,步骤(1)中所述的PCR扩增人NXP2的N端为NM\_015358.2的80-1576bp,即Q14149的1-500aa;所述的PCR扩增人NXP2的C端为NM\_015358.2的1274-2896bp,即Q14149的400-939aa。

5. 根据权利要求1所述的肌炎特异性自身抗体NXP2抗体的免疫印迹检测方法,其特征在于,采用NXP2抗体阳性的肌炎患者血清作为一抗、兔抗人IgG H&L作为二抗。

6. 根据权利要求1-5任一项所述的肌炎特异性自身抗体NXP2抗体的免疫印迹检测方法的应用,其特征在于,用于检测肌炎患者的抗NXP2自身抗体。

## 肌炎特异性自身抗体NXP2抗体的免疫印迹检测方法与应用

### 技术领域

[0001] 本申请属于生物技术领域,具体地说,涉及肌炎特异性自身抗体NXP2抗体的免疫印迹检测方法与应用。

### 背景技术

[0002] 特发性炎症性肌病(idiopathic inflammatory myopathies,IIM),又称肌炎(myositis),是一组以侵害骨骼肌为主的系统性自身免疫性疾病,自身免疫的异常是肌炎的发生、发展的关键。根据最近的诊断分类标准,肌炎可分为多发性肌炎(polymyositis,PM)、皮肌炎(dermatomyositis,DM)、免疫介导的坏死性肌病(immune-mediated necrotizing myopathy,IMNM)、非特异性肌炎(nonspecific myositis,NSM)和散发性包涵体肌炎(sporadic inclusion body myositis,sIBM)。肌炎临床特点表现为四肢近端肌无力、特征性皮疹、系统性损害以及血清中存在多种自身抗体,这些自身抗体与临床表型密切相关(Mei Zong&Ingrid E.Lundberg.Pathogenesis,classification and treatment of inflammatory myopathies.Nature Review sRheumatology,2011,7,297-306.)。

[0003] 肌炎患者的自身抗体主要分为肌炎特异性自身抗体(myositis specific autoantibodies,MSAs)和肌炎相关性自身抗体(myositis associated autoantibodies,MAAs)。传统的MSAs包括抗氨基酰tRNA合成酶(aminoacyl-tRNA synthetase,ARS)抗体、抗Mi-2抗体和抗信号识别颗粒(signal recognition particle,SRP)抗体,近些年也发现多种新的MSAs,如抗黑色素瘤分化相关基因(melanoma differentiation associated gene 5,MDA5)抗体、抗核基质蛋白2(nuclear matrix protein 2,NXP2)抗体、抗转录中介因子1(transcriptional intermediary factor 1,TIF1)抗体等,MSAs一般仅见于IIM患者,对于疾病的临床-血清学分类有重要的指导意义(Sarah L Tansley,Zoe E,Betteridge,Neil J,McHugh.The diagnostic utility of autoantibodies in adult and juvenile myositis.Current Opinion in Rheumatology,2013,25(6):772-777.)。

[0004] NXP-2蛋白(又名MORC3)定位于细胞核的PML(早幼粒细胞性白血病)核体,在RNA代谢及维持细胞核结构方面起到了重要的作用,还能募集和激活p53通路,调节多种细胞因子的转录(Kimura Y,Sakai F,Nakano O,Kisaki O,Sugimoto H,Sawamura T,Sadano H,Osumi T.The newly identified human nuclear protein NXP-2possesses three distinct domains,the nuclear matrix-binding,RNA-binding,and coiled-coil domains.J Biol Chem.2002;277:20611-20617)。Oddis等发现18%儿童皮肌炎(juvenile dermatomyositis,JDM)患者的血清中存在一种针对分子质量为140KD蛋白质的自身抗体,称为MJ(myositis iuvenile)/P140抗体(Oddis CV,Fertig N,Goel A,Espada G,Confalone Gregorian M,Maldonado Cocco JA,et al.Clinical and serological characterization of the anti-MJ antibody in childhood myositis.Arthritis Rheum.1997;40:S139.)。随后Targoff IN等通过免疫沉淀法确认了该抗体的靶抗原是NXP-2(Targoff IN,Trieu EP,Levy-Neto M,Fertig N,Oddis CV.Sera with autoantibodies

to the MJ antigen react with NXP2. *Arthritis Rheum.* 2007;56:S787)。Gunawardena等回顾英国及爱尔兰JDM的研究中发现,23%的JDM患者该抗体阳性,抗体阳性的患者更容易发生钙质沉着(Gunawardena H1, Wedderburn LR, Chinoy H, Betteridge ZE, North J, Ollier WE, Cooper RG, Oddis CV, Ramanan AV, Davidson JE, McHugh NJ; Juvenile Dermatomyositis Research Group, UK and Ireland. Autoantibodies to a140-kd protein in juvenile dermatomyositis are associated with calcinosis. *Arthritis Rheum.* 2009 Jun;60(6):1807-14.)。Cefibelli等研究了58例意大利成年PM/DM患者,发现30%的DM和8%的PM患者血清中抗NXP-2抗体阳性。抗NXP-2抗体阳性的患者发病年龄较轻,向阳疹及皮下钙质沉着较明显,而少有内脏损伤和肿瘤的发生,对治疗反应更好(Angela Ceribelli, Micaela Fredi, Mara Taraborelli, Ilaria Cavazzana, Franco Franceschini, Marzia Quinzanini, Angela Tincani, Steven. J. Ross, Jason YF Chan, Brad A Pauley, Edward KL Chan, Minoru Satoh. Anti-MJ/NXP-2 autoantibody specificity in a cohort of adult Italian patients with polymyositis/dermatomyositis. *Arthritis Res Ther.* 2012;14(2):R97.)。Ichimura等研究了507例成年日本IIM患者,发现该抗体的阳性率在PM和DM患者中的阳性率均为1.6%。所有抗体阳性的患者均有明显的肌无力,血清肌酸激酶显著升高,但与DM的皮疹无明显相关性。另外37.5%的抗体阳性DM患者合并肿瘤(Ichimura Y, Matsushita T, Hamaguchi Y, Kaji K, Hasegawa M, Tanino Y, Inokoshi Y, Kawai K, Kanekura T, Habuchi M, Igarashi A, Sogame R, Hashimoto T, Koga T, Nishino A, Ishiguro N, Sugimoto N, Aoki R, Ando N, Abe T, Kanda T, Kuwana M, Takehara K, Fujimoto M. Anti-NXP2 autoantibodies in adult patients with idiopathic inflammatory myopathies: possible association with malignancy. *Ann Rheum Dis.* 2012 May;71(5):710-3.)。卢昕等检测我国IIM患者NXP-2抗体水平,发现抗体阳性率为5.1%,阳性患者发病年龄较低,而皮下钙质沉着的发生率较高(卢昕,袁凯,杨阡波,彭清林,王艳,张学智,王国春.抗核基质蛋白2抗体在特发性炎症性肌病中的分布及临床意义. *中华风湿病学杂志*, 2014, 18(4))。不同人群抗体阳性率及与临床相关性的差异可能与不同种族、地域、检测方法以及样本量大小有关,因此抗NXP2自身抗体在特发性炎症性肌病患者中的检测具有重要的临床意义。

[0005] 检测自身免疫性疾病自身抗体的主要方法有酶联免疫吸附法(ELISA)、放射标记的免疫沉淀方法、免疫印迹法,但是目前国内还没有商业化的检测NXP2抗体的ELISA试剂盒以及免疫印迹膜条,大部分实验室对于NXP2抗体的检测包括:(1)购买纯化的NXP2蛋白包被酶标反应板,加入待测血清后孵育,使用酶标的抗人免疫球蛋白抗体可以检测出与抗原结合的抗体,随后用合适的酶底物进行显色;(2)购买纯化的NXP2蛋白与待测血清进行免疫沉淀,采用western Blot检测沉淀后的产物;(3)采用<sup>35</sup>S标记HeLa细胞,然后用待测血清进行免疫沉淀,SDS-PAGE电泳分离沉淀物、放射自显影,这是检测MSA的金标准。以上方法各有优缺点,酶联免疫吸附法为自身抗体的检测提供了敏感性高且较迅速的方法,但是目前尚无商业化的检测NXP2抗体的ELISA试剂盒,这种方法需要高度纯化的抗原,而且抗原包被的条件需要最优化,容易出现假阳性的结果,需要批量操作,对于发病率不是那么高的炎症性肌病,导致成本的增加;作为金标准的放射标记免疫沉淀法有很高的特异性和敏感性,而且这种方法沉淀的是以天然构象存在的抗原以及与靶抗原相互作用的蛋白分子,但是放射同位

素只能用于装备良好的实验室,并要求严格控制,不适合推广使用。

## 发明内容

[0006] 为克服上述现有技术的缺陷,本发明的目的在于提供肌炎特异性自身抗体NXP2抗体的免疫印迹检测方法。

[0007] 本发明的目的还在于提供上述检测方法的应用。

[0008] 上述目的通过以下技术方案实现:

[0009] 肌炎特异性自身抗体NXP2抗体的免疫印迹检测方法,包括以下步骤:

[0010] (1) 利用引物对NXP2-F/NXP2-R2和引物对NXP2-F2/NXP2-R从pCMV-myc-NXP2全长质粒中分别PCR扩增人NXP2的N端(Genbank:NM\_015358.2,80-1576bp)或C端(Genbank:NM\_015358.2,1274-2896bp);

[0011] (2) 用胶回收试剂盒(Omega,D2500-01)回收纯化步骤(1)所述的NXP2的N端或C端,然后克隆至pCMV-myc载体,构建含NXP2N端或NXP2C端且带有Myc标签的pCMV-myc-NXP2N或pCMV-myc-NXP2C质粒;

[0012] (3) 酶切鉴定确定步骤(2)所述pCMV-myc-NXP2N、pCMV-myc-NXP2C质粒的插入子,并测序验证其NXP2N端、NXP2C端序列和读码框的准确性;

[0013] (4) 将步骤(3)所述验证后的pCMV-myc-NXP2N或pCMV-myc-NXP2C质粒瞬时转染人胚肾HEK293细胞48小时,通过Western Blot法分别用c-myc抗体、NXP2抗体检测其在HEK293细胞中的过表达;

[0014] (5) 将步骤(4)中所述过表达NXP2N端或NXP2C端的HEK293细胞裂解液进行SDS-PAGE凝胶电泳,分别用NXP2抗体阳性的肌炎患者血清和正常人的血清作为一抗、兔抗人IgG H&L作为二抗检测,证实NXP2抗体阳性血清能够特异性识别步骤(4)中所述HEK293细胞过表达的带有myc标签的NXP2N端和NXP2C端;

[0015] (6) 将步骤(4)中所述过表达NXP2C端的HEK293细胞裂解液进行SDS-PAGE凝胶电泳,用待测肌炎患者血清作为一抗、兔抗人IgG H&L作为二抗进行检测。

[0016] 步骤(1)中所述的引物对NXP2-F/NXP2-R2包括引物NXP2-F和引物NXP2-R2,所述引物NXP2-F的序列如SEQ ID NO:1所示,所述引物NXP2-R2的序列如SEQ ID NO:2所示。

[0017] 步骤(1)中所述引物对NXP2-F2/NXP2-R包括引物NXP2-F2和引物NXP2-R,所述引物NXP2-F2的序列如SEQ ID NO:3所示,所述引物NXP2-R的序列如SEQ ID NO:4所示。

[0018] 步骤(1)中所述的PCR扩增人NXP2的N端为NM\_015358.2的80-1576bp,即Q14149的1-500aa;所述的PCR扩增人NXP2的C端为NM\_015358.2的1274-2896bp,即Q14149的400-939aa。

[0019] 上述方法用于检测肌炎患者的抗NXP2自身抗体。

[0020] 与现有技术相比,本申请可以获得包括以下技术效果:

[0021] 1) 在真核细胞中表达抗原表位所在的NXP2N或NXP2C端,该蛋白分子的分子量变小,更易于转染和高表达,增加免疫印迹的敏感性;

[0022] 2) HEK293细胞中高表达的NXP2N或NXP2C末端是以天然构象与血清中的NXP2抗体相结合,增加免疫印迹的特异性。

## 附图说明

[0023] 此处所说明的附图用来提供对本申请的进一步理解,构成本申请的一部分,本申请的示意性实施例及其说明用于解释本申请,并不构成对本申请的不当限定。

[0024] 图1是本发明pCMV-myc-NXP2N或pCMV-myc-NXP2C质粒的酶切鉴定结果图;

[0025] 图2是本发明含NXP2N端或NXP2C端并且带有Myc标签的pCMV-myc-NXP2N或pCMV-myc-NXP2C质粒图谱;

[0026] 图3是本发明测序证实pCMV-myc-NXP2N或pCMV-myc-NXP2C质粒中NXP2的N端(a)或C端(b)序列和读码框的准确性对照图;

[0027] 图4是本发明Western Blot法检测pCMV-myc-NXP2N或pCMV-myc-NXP2C质粒在HEK293细胞的过表达;其中,(a)为c-myc抗体检测pCMV-myc-NXP2N或pCMV-myc-NXP2C质粒在HEK293细胞的过表达;(b)为NXP2抗体检测pCMV-myc-NXP2N或pCMV-myc-NXP2C质粒在HEK293细胞的过表达;

[0028] 图5是本发明将过表达NXP2N端或NXP2C端的HEK293细胞裂解液进行SDS-PAGE凝胶电泳,用NXP2抗体阳性的肌炎患者血清(a)或正常人的血清(b)作为一抗,用兔抗人IgG H&L作为二抗进行检测,进一步证实NXP2抗体阳性血清能够识别HEK293细胞中的带有myc标签的NXP2N端和NXP2C端;

[0029] 图6是本发明的方法筛选肌炎患者血清中的NXP2抗体;其中,IM为肌炎。

## 具体实施方式

[0030] 以下将配合附图及实施例来详细说明本申请的实施方式,借此对本申请如何应用技术手段来解决技术问题并达成技术功效的实现过程能充分理解并据以实施。

[0031] 肌炎特异性自身抗体NXP2抗体的免疫印迹检测方法,包括以下步骤:

[0032] (1) 设计引物对NXP2-F(5'-CGGTCGACCGCGCGCAGCCACC-3')和NXP2-R2(5'-GCGGTACCTTAGCTTGGAGTTGAAAGAGC-3')、引物对NXP2-F2(5'-CGGTCGACCGAAGATATACAGAAAGCGTCC-3')和NXP2-R(5'-GCGGTACCTTAAGTACTACTGATTTCACTCATT-3'),然后从pCMV-myc-NXP2全长质粒中分别扩增人NXP2的N端(Genbank:NM\_015358.2,80-1576bp)或C端(Genbank:NM\_015358.2,1274-2896bp)。

[0033] (2) 用胶回收试剂盒(Omega,D2500-01)回收纯化PCR片段,用SalI和KpnI限制性内切酶进行双酶切,与SalI和KpnI已双酶切的pCMV-myc载体连接过夜,转化JM109细菌感受态,在含50ug/ml氨苄青霉素的平板上筛选阳性克隆,小量提取阳性克隆的质粒DNA,用SalI和KpnI酶切pCMV-myc-NXP2N或pCMV-myc-NXP2C质粒DNA,结果显示两种质粒各含1.5kb或1.6kb的插入子(如附图1所示)。

[0034] (3) 将该两种质粒DNA进行测序,证实NXP2N端或C端序列和读码框的准确性(如附图3所示),结果提示含NXP2N端(1-500aa)或NXP2C端(400-939aa)并且带有Myc标签的质粒pCMV-myc-NXP2N或pCMV-myc-NXP2C构建成功(如附图2所示)。

[0035] (4) 将4ug pCMV-myc-NXP2N或pCMV-myc-NXP2C质粒或pCMV-myc质粒瞬时转染HEK293细胞48小时,SDS裂解液裂解HEK293细胞,进行SDS-PAGE凝胶电泳和转膜,一张膜采

用c-myc抗体进行孵育,发现转染pCMV-myc-NXP2N质粒的HEK293细胞中有约为60Kd的特异性条带,转染pCMV-myc-NXP2C质粒的HEK293细胞中有两条分别为70Kd和100Kd的特异性条带,而转染pCMV-myc质粒的HEK293细胞中没有特异性条带(如附图4(a)所示);同时,另一张膜采用NXP2抗体进行孵育,发现NXP2C端能被NXP2抗体识别而NXP2N端不能被NXP2抗体识别(如附图4(b)所示),以上结果提示pCMV-myc-NXP2N或pCMV-myc-NXP2C质粒能在HEK293细胞中过表达,表达的蛋白质约为60Kd的带有Myc标签的NXP2N端或70Kd和100Kd的带有Myc标签的NXP2C端。

[0036] (5) 将过表达NXP2N端或NXP2C端的HEK293细胞裂解液进行SDS-PAGE凝胶电泳和转移至PVDF膜上,用NXP2抗体阳性血清(1:1000稀释)作为一抗4℃孵育过夜,用兔抗人IgG H&L作为二抗孵育1h,ECL化学发光,发现NXP2抗体阳性血清能够特异性识别60kDa带有Myc标签的NXP2N端或100kDa带有Myc标签的NXP2C端(如附图5a所示);而正常人的血清没有条带(如附图5b所示)。

[0037] (6) 将过表达NXP2C端的HEK293细胞裂解液进行SDS-PAGE凝胶电泳和转移至PVDF膜上,用待测肌炎患者的血清(1:1000稀释)作为一抗4℃孵育过夜,用兔抗人IgG H&L作为二抗孵育1h,ECL化学发光,图中显示NXP2抗体检测为阳性的患者(如附图6所示)。

[0038] 上述说明示出并描述了发明的若干优选实施例,但如前所述,应当理解发明并非局限于本文所披露的形式,不应看作是对其他实施例的排除,而可用于各种其他组合、修改和环境,并能够在本文所述发明构想范围内,通过上述教导或相关领域的技术或知识进行改动。而本领域人员所进行的改动和变化不脱离发明的精神和范围,则都应在发明所附权利要求的保护范围内。

## 序列表

<110> 中南大学

<120> 肌炎特异性自身抗体NXP2抗体的免疫印迹检测方法与应用

<130> 2016

<160> 2

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 23

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 1

cggtcgaccg cggcgcagcc acc 23

<210> 2

<211> 29

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 2

gcggtacctt agcttggagt tgaaagagc 29

<210> 3

<211> 29

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 3

cggtcgaccg aagatataca gaagcgtcc 29

<210> 4

<211> 33

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 4

gcggtacctt aagtactact gatttcacte att 33

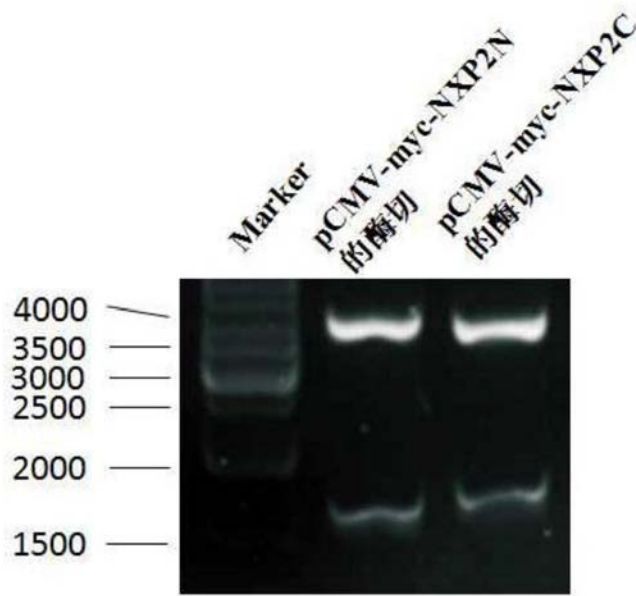


图1

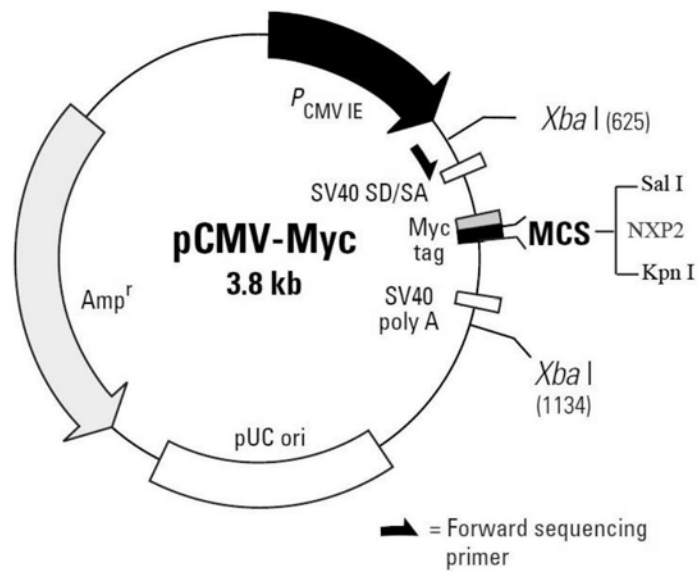
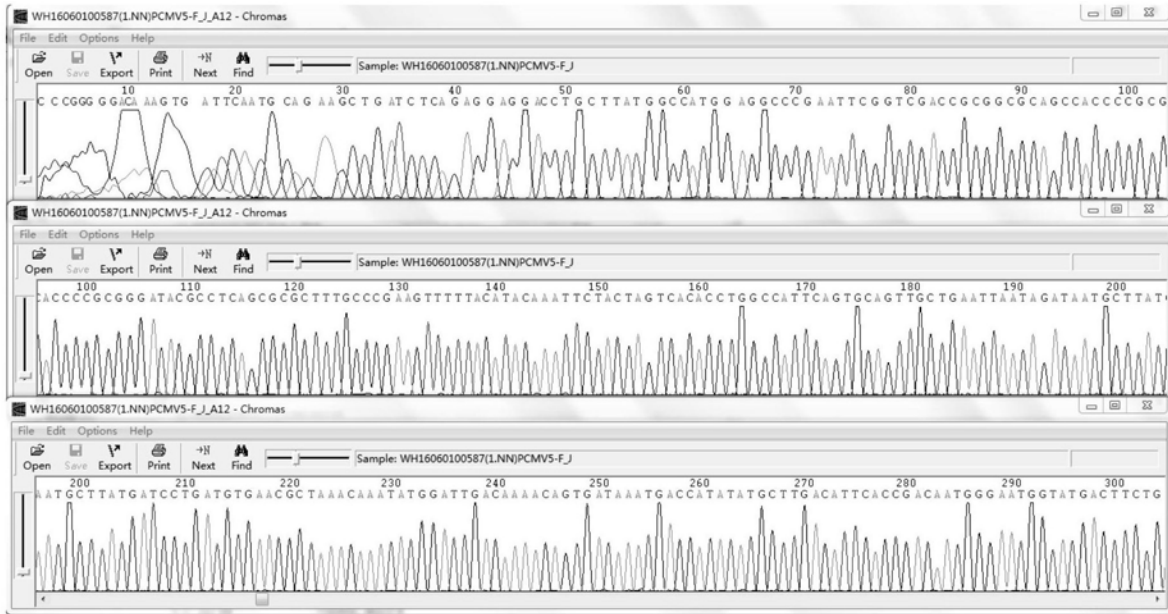
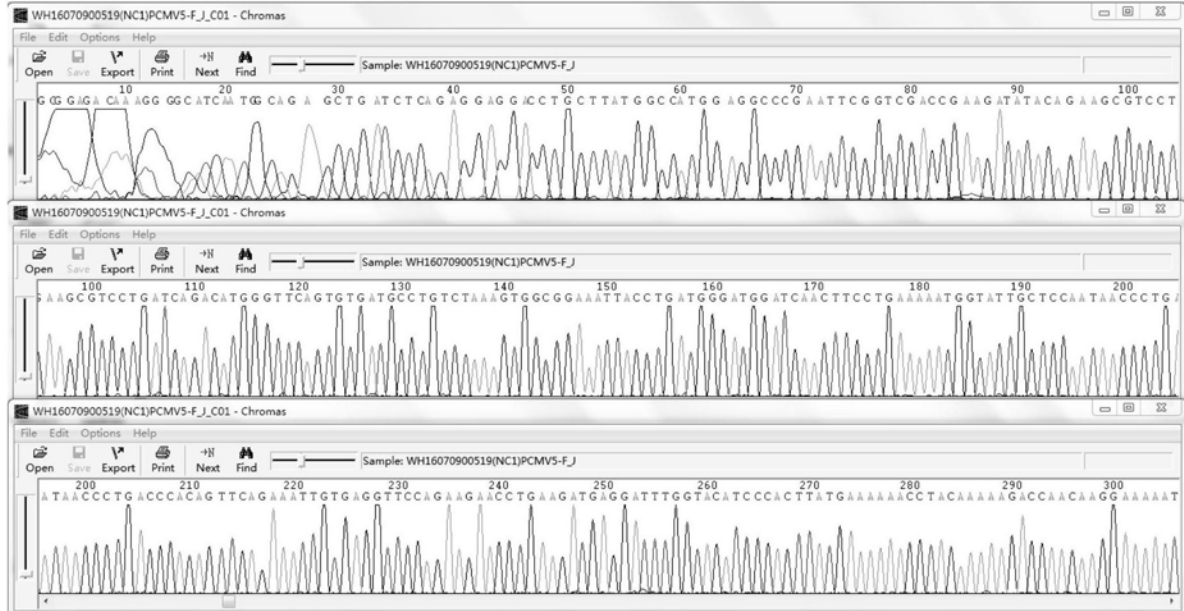


图2



(a)



(b)

图3

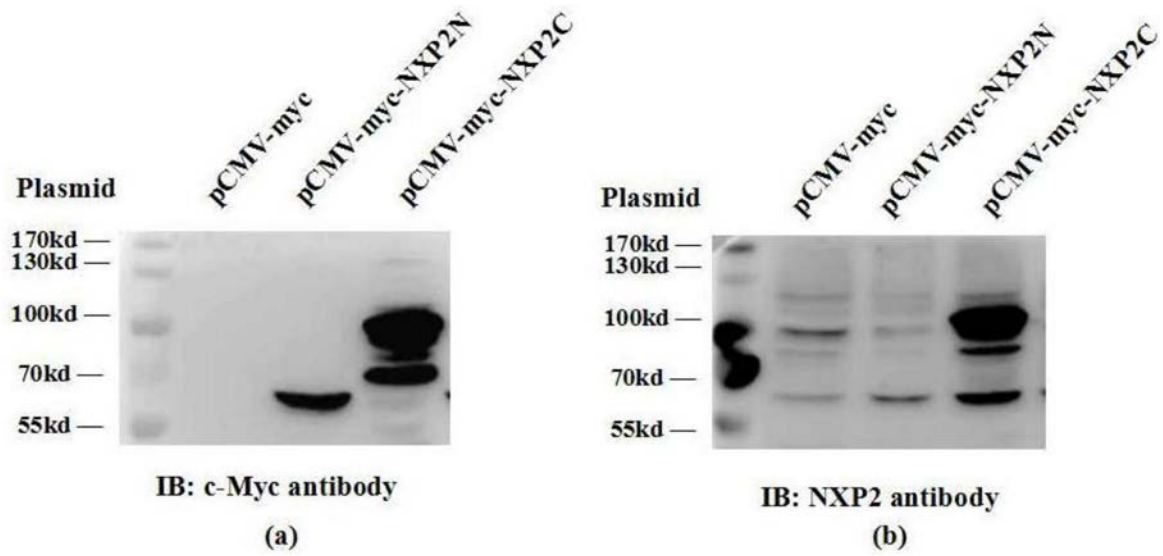
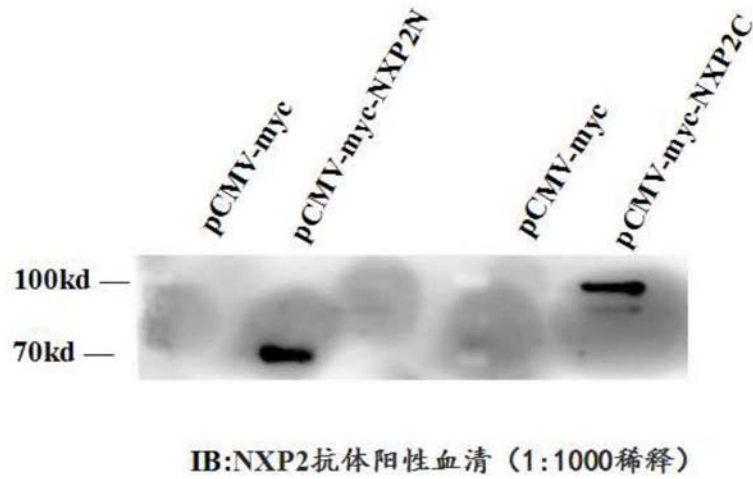
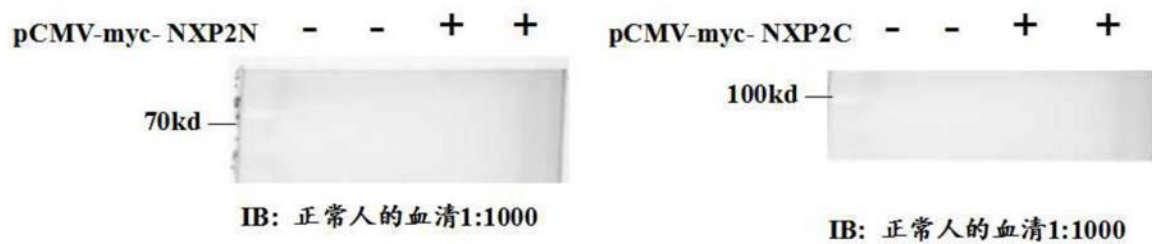


图4



(a)



(b)

图5

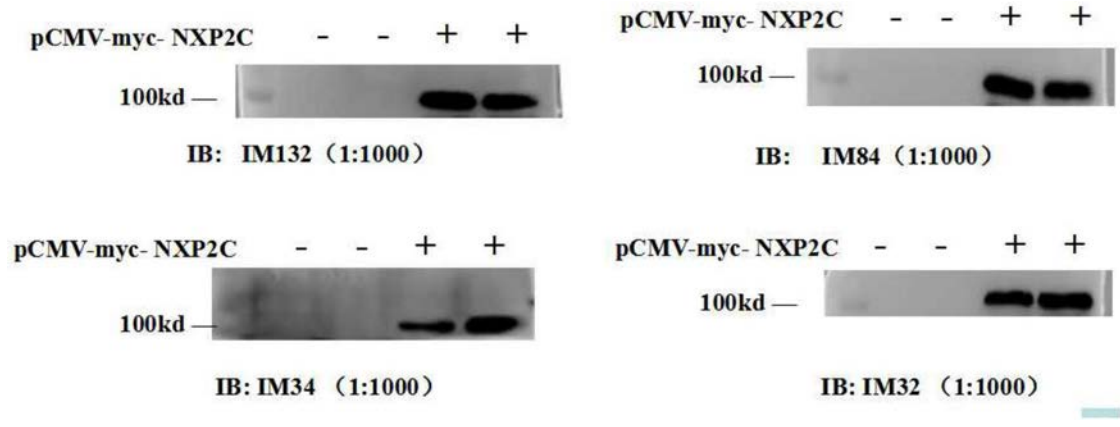


图6

专利名称(译)	肌炎特异性自身抗体NXP2抗体的免疫印迹检测方法与应用		
公开(公告)号	<a href="#">CN107144692A</a>	公开(公告)日	2017-09-08
申请号	CN201710279994.9	申请日	2017-04-26
[标]申请(专利权)人(译)	中南大学		
申请(专利权)人(译)	中南大学		
当前申请(专利权)人(译)	中南大学		
[标]发明人	张华莉 杨洋 黄莉 王莉 罗卉 左晓霞 朱红林 刘瑛 王国春 李懿莎 曹航 刘可 刘梅冬 陈广文 肖献忠		
发明人	张华莉 杨洋 黄莉 王莉 罗卉 左晓霞 朱红林 刘瑛 王国春 李懿莎 曹航 刘可 刘梅冬 陈广文 肖献忠		
IPC分类号	G01N33/558 G01N33/535		
CPC分类号	G01N33/558 G01N33/535		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

本发明公开了肌炎特异性自身抗体NXP2抗体的免疫印迹检测方法与应用，构建含NXP2 N端(1-500aa)或NXP2 C端(400-939aa)带有Myc标签的质粒pCMV-myc-NXP2N或pCMV-myc-NXP2C，用待测肌炎患者的血清作为一抗、免抗人IgG H&L作为二抗确定肌炎患者血清中是否具有NXP2自身抗体；解决了目前国内还没有商业化的检测NXP2抗体的ELISA试剂盒以及免疫印迹膜条的问题，以及自行包被NXP2抗原的ELISA试剂盒的高成本、高假阳性率和放射标记免疫沉淀法的安全性等问题。

