〔19〕中华人民共和国专利局

〔11〕公开号 CN 1045184A

〔12〕发明专利申请公开说明书

〔21〕 申请号 90101000.6

〔51〕 Int.Cl[5]

G01N 33/50

〔43〕公开日 1990年9月5日

〔22〕申请日 90.1.24

〔30〕优先权

〔32〕89.1.24 〔33〕SE 〔31〕8900243

〔71〕申请人 阿斯特拉公司

地址 瑞典南泰利耶

〔72〕发明人 B·V·拉维·库马

V·苏里雅纳拉雅纳 V·拉维

A·钱德拉穆希

〔74〕专利代理机构 中国专利代理有限公司

代理人 曹恒兴

C12P 21/00

说明书页数: 15 附图页数: 5

〔54〕发明名称 一种新的免疫诊断方法

〔57〕摘要

公开了一种通过体外维持猪囊尾蚴以得到抗原的方法。这些抗原可用于检验神经囊尾蚴病病例的酶联免疫吸附试验中。

<35>

权　利　要　求　书

1．猪囊尾蚴的排泄／分泌（E－S）抗原在神经囊尾蚴病的免疫诊断中的应用。

2．根据权利要求1的应用，其中使用了表观分子量约为97，000、66，000、50，000和38，000的抗原。

3．根据权利要求1的应用，其中使用了表观分子量约为66，000和38，000的抗原。

4．根据权利要求1、2和3中任一项的应用，其中设计免疫检测法以检测病人体液如CSF和血清中的抗体。

5．根据权利要求1、2和3中任一项的应用，其中设计免疫检测法以检测病人体液如CSF和血清中的抗原。

6．体外维持猪囊尾蚴，以制备权利要求2和3中限定之抗原的方法。

7．由猪囊尾蚴排泄／分泌的抗原，其具有以SDS－PAGE估计的约为97，000或66，000或50，000或38，000道尔顿的表观分子量。

8．根据权利要求7的抗原，特征在于它是一种用SDS－PAGE法估测表观分子量约为97，000或50，000的糖蛋白。

9．根据权利要求7的抗原，其中表观分子量约为38，000的蛋白质包含的部分氨基酸顺序为缬氨酸－谷氨酸－酪氨酸－苏氨酸－胱氨酸－苏氨酸（VEYTCT）。

10．一种可由猪囊尾蚴分泌或排泄而得到的抗原，其具有以SDS－PAGE法估测约为97，000或66，000或

50，000或38，000的表观分子量。

11．一种可由猪囊尾蚴分泌或排泄而得到的抗原，其具有以SDS－PAGE法估测约为97，000、50，000的表观分子量。

12．一种可由猪囊尾蚴分泌或排泄而得到的抗原，其包含部分氨基酸顺序为缬氨酸－谷氨酸－酪氨酸－苏氨酸－胱氨酸－苏氨酸（VEYTCT）。

13．根据权利要求7、8、9、10、11和12之任一项的抗原在制备抗猪囊尾蚴感染之疫苗中的应用。

14．得到权利要求7、8、和9中限定之抗原的方法，其包括下列步骤：

a．在含有抗生素的无血清细胞生长培养基中体外维持由感染的猪肌肉分离的完整、未被损伤的囊尾蚴。

b．在通过更换培养基以维持的前24－60小时内除去所有抗原。

c．然后以一定间隔期收集培养基，直到囊泡外凸为止，

d．除去膜碎片，并

e．分离抗原。

15．诊断活动的人NCC的方法，其包括：

使待诊断者的CSF与至少一种由体外培养的猪囊尾蚴排泄或分泌的 以SDS－PAGE法测定表观分子量约为97，000或66，000或50，000或38，000道尔顿的抗原或所说抗原的混合物相互反应。

说　　明　　书

一种新的免疫诊断方法

猪囊尾蚴即猪肉绦虫的幼虫形式，其可感染人脑引起严重的神经系统症状，即所说的神经囊尾蚴病（ＮＣＣ）。根据囊泡在颅内的定位，可常见有下列临床表现。

定　位	临床症状	后　遗　症
脑实质	癫痫	
	占位性损伤（ＳＯＬ）	运动或感觉缺陷
	精神病	
	大脑炎	
脑　膜	慢性脑膜炎	脑积水
		脑神经瘫
		运动和感觉缺陷
脑　室	ＳＯＬ	脑积水

这里描述的所有临床症状可由许多致病因素引起，神经囊尾蚴病的常规鉴别诊断是神经系统的结核分支杆菌感染。这种疾病的诊断是基于对头颅的放射学检查。颅内死亡的钙化囊泡在Ｘ光下显示为致密的射线不透过性损伤，而活囊泡在计算机控制的断层扫描图（ＣＡＴ－ＳＣＡＮ）上则呈现为低密度或高密度损伤。近年已使用中枢神经系统的磁谐振图象技术观察活的囊泡。能否通过这些影象鉴定出囊泡，主要取决于囊泡的大小及周围宿主组织的反应情况。但在流行这种疾

病的许多发展中国家，大多不容易得到这种图象装置，而迫切需要建立一种更为简单的诊断方法。因此，要求有一种能够将神经囊尾蚴病与其他神经病鉴别开的免疫诊断试验法。已有的免疫学试验大多都是基于检测抗特定生物体原之抗体的。此外，许多试验都是作为流行病学调查的手段而建立的血清诊断试验，而且已有这些试验均不适于用作神经囊尾蚴病的特异性诊断方法。

试验的特异性和敏感性主要取决于试验中使用的抗原。本发明描述了一种制备能提高免疫诊断之特异性和敏感性的猪囊尾蚴抗原的方法。

可作为囊泡的总匀浆液（ 1 ），或囊泡固体部分即泡壁与头节或单纯泡壁的匀浆液（ 2 ）来制备猪肉绦虫幼虫的粗提物。某些情况下，也可用囊泡作为抗原（ 3 ）。该匀浆液通常要以 15,000—20,000 g 离心 15 至 30 分钟，以除去细胞碎片和核等。用丙酮提取匀浆液除去大部分脂类。并用于补体结合试验（ 4 ）。这些粗提物和总抗原可用于许多免疫检测法中．如被动血凝试验（ 5、3 ）、免疫电泳（ 1 ）和酶联免疫吸收试验〔ＥＬＩＳＡ）（ 1，6 和 7 ）〕。

Kuhn 等人（ 8 ）描述了使用囊泡的总匀浆液所作的ELISA试验，并将试验的敏感性归因于一组蛋白质抗原。这些抗原未经纯化，也没有试验它们的特异性。总匀浆液除含有可看到的并经Western印迹法鉴定为免疫性材料的蛋白质外，还含有脂类及碳水化合物。其中没有证实非蛋白质抗原浓度对ＥＬＩＳＡ之总体敏感性的影响。虽然在ＥＬＩＳＡ试验中使用了表现有纤维结合素性质的单一抗原（抗原Ｂ），但其敏感性不能令人满意（ 9 ）。

在免疫诊断中，使用寄生虫的总匀浆液作为抗原有几个方面的缺

点；（ｉ）它含有几个能与其他ＣＮＳ病原体发生免疫学交叉反应的抗原决定基；（ｉｉ）已证明几种寄生蠕虫共有交叉反应性抗原(10)。在发展中国家如印度、墨西哥、巴西、中国、泰国及中非和亚洲国家，人群中寄生虫感染是很普遍的，许多人体内都携带抗这种交叉反应性抗原的血清抗体。当这些人感染了能打破血脑屏障的疾病时，血清抗体即可进入脑脊髓液（ＣＳＦ）中，干扰囊尾蚴病的诊断，导致假阳性结果。

考虑到总匀浆液缺乏特异性，而试图鉴定并纯化种和组织特异性抗原，即得自头节和囊泡液的抗原。作为猪肉绦虫种特异性抗原，已鉴定了表观分子量为大约26，000和8，000的两种多肽。这些抗原在免疫印迹试验中可与得自受猪肉绦虫感染之病人的血清反应，但不与受其他蠕虫感染之病人的血清反应（１１）。这些抗原的特异性或对其他相关ＣＮＳ疾病的敏感性尚未被证实。已证明使用抗囊泡液总蛋白的单克隆抗体由囊泡液中纯化的抗原在免疫诊断中是很特异的，但用于检测ＮＣＣ则缺乏敏感性（１２）。使用单克隆抗体纯化的表观分子量约为８０，０００和１０，０００的头节特异性蛋白质，在囊尾蚴病的血清学诊断中有１００％的敏感性。据称这些抗原可用于区分绦虫病和囊尾蚴病，但其在鉴别神经囊尾蚴病与其他系统性囊尾蚴病中的作用则没有得到证实（１３）。

本发明人在实验室中进行的一项研究进一步说明了用总匀浆液作抗原的缺点（１４），现总结如下：

制备囊泡匀浆并用超声处理(８×30秒脉冲)。将匀浆溶解于1％ＳＤＳ中并于１００℃下用１％β－巯基乙醇处理，然后在Sephacryl　Ｓ－３００柱上进行凝胶过滤，分离成三个部分：

部分Ⅰ：分子量大于66KD的囊泡抗原

部分Ⅱ：分子量在25—66KD之间的囊泡抗原

部分Ⅲ：分子量在14—35KD之间的囊泡抗原

图1：在10%SDS—PAGE上分析得自凝胶过滤的三个峰值部分。泳道1：第3个峰；泳道2：第2个峰；泳道3：第1个峰；泳道4：分子量标志（94、67、43、30、20.1和14.1KD）。这三个部分的分子量范围已在文中给出。

使用囊尾蚴抗原的上述三个部分按下述方法进行ELISA试验由各种神经病人随机收集150份CSF样品并对这三个部分进行检测。以浓度为5μg／ml（100μl／小井）的抗原（在50mM碳酸氢盐缓冲液（pH9.6）中）将96小井微量滴定板（Dynatech）包被过夜。用2%BSA封闭未包被部分并以1／25、1／125和1／625倍稀释液检测CSF。使用兔抗人IgG过氧化物酶结合物（Sigma，1:1000稀释）显示结合的人IgG。使用邻苯二胺作显色剂（4mg／10ml），0.3%H_2O_2作底物。

表1中总结了这150份样品的试验结果。

表　　1

序号	诊断	病例数	部分Ⅰ			部分Ⅱ			部分Ⅲ		
			+++	++	+	+++	++	+	+++	++	+
1	CAT－SCAN证实的囊尾蚴病	6	6	—	—	4	2	—	2	2	2
2	证实的结核性脑膜炎（TBM）培养物	11	5	4	1	4	3	4	—	1	2
3	强可疑的TBM	24	3	5	4	4	1	5	3	2	3
4	病因学上难以追踪的慢性脑膜炎	20	—	5	4	—	4	5	—	—	6
5	已证实的浓性脑膜炎培养物	7	—	—	—	—	—	—	—	—	—
6	多发性脑硬化样品	30	—	—	—	—	—	—	—	—	—
7	脑肿瘤＋痴呆＋癫痫＋病毒性大脑炎	52	—	—	—	—	—	—	—	—	—

+++：CSF达到1／625稀释时呈阳性；++：CSF只在1／125稀释时呈阳性；

+：CSF只在1／25稀释时呈阳性。2、3和4类在490nm处平均吸光率比1类小3－5倍。

由这些数据可得出下列结论:

虽然试验对于识别所有神经囊尾蚴病例是足够敏感的，但在结核性脑膜炎的病例中出现了最大假阳性结果。因此，当有这两种疾病流行时，该试验是不适用的。

所显示的结核性脑膜炎ＣＳＦ与囊泡抗原的反应，是由于分支杆菌与囊泡抗原之间的交叉反应性。

1．结核分支杆菌超声处理产物可抑制囊尾蚴病阳性ＣＳＦ与囊泡抗原的结合，但没有全部消除此反应。

2．这种抑制作用随着分支杆菌抗原浓度的增加而增加。

3．抗分支杆菌超声处理产物的兔抗血清可与囊泡抗原反应。

上述观察表明，粗抗原确实含有与其他ＣＮＳ病原体发生交叉反应的抗原决定基。

囊尾蚴是不同于单细胞微生物的多细胞生物体，其不能被巨噬细胞或粒细胞或其他抗原呈现细胞所吞噬和处理。因此，人类免疫系统很少能获得对该寄生虫之所有蛋白质的敏感性，特别是在免疫学上特殊的部位如中枢神经系统（ＣＮＳ）更是如此。为此，由这些寄生虫分泌进入宿主体液内的抗原（称为Ｅ－Ｓ抗原）在免疫学上是很重要的。许多寄生蠕虫的Ｅ－Ｓ抗原是通过在组织培养基中维持各发育阶段的蠕虫并由生长培养基中纯化而得到的（15）。也可于体外用血清和组织提取物维持猪囊尾蚴的生长（16）。可以在Dulbecco氏基本培养基（ＤＭＥＭ）和磷酸盐缓冲盐水（ＰＢＳ）中短时期保持这些寄生虫并用Ｃ氨基酸激动之，表明它们是具有代谢活性的（17）。但在培养基中只检测到很少量放射活性标记的蛋白质，并且没有试验过这些抗原在免疫诊断中的实用性。

本发明是基于由体外保持寄生虫得到的猪囊尾蚴E－S抗原可能与作为囊泡体内代谢过程之一部分而排泄／泌出囊泡的抗原密切相关这一假定而建立的。因此，它们可能为基于检测病人体液如CSF和血清中抗体而设计的免疫诊断试验提供特异性和敏感性。可在病人的CSF中找到这些抗原的同种抗原或降解产物，这就为基于抗原检测而设计免疫诊断方法提供了基础。显然有可能制得抗E－S抗原的多克隆单一特异性抗体或单克隆抗体，然后将其用于这种抗原检测试验中，由于其中有些抗原可为宿主提供保护性免疫力，故可将这些抗原制成能预防猪囊尾蚴感染的疫苗。

本发明描述了一种在无血清细胞培养基中长期保持猪囊尾蚴的方法，以及使用由寄生虫产生并泌入培养基中的抗原对NCC进行免疫诊断的方法，该方法包括使病人的CSF与E－S抗原相互反应。这里强调的是，在鉴定NCC中使用该抗原没有受到其他形式之全身性囊尾蚴病的干扰。这种新的诊断方法也可用于诊断肉猪的猪囊尾蚴感染。

囊泡的来源和维持

由屠宰场得到感染囊尾蚴的猪肌肉。用乙醇洗去肌肉表面上的污染物。在不破坏囊泡壁的情况下切下囊泡（如囊泡被破坏则应弃去）并置于每毫升含1000单位青霉素G、40μg庆大霉素和5μg两性霉素B的盐水中。用含上述抗生素的盐水彻底清洗囊泡。然后再用无血清RPMI1640培养基或含Earles 盐或Hank's 盐的Eagles 基本培养基（MEM）洗涤。将囊泡放在每毫升含1000单位青霉素G和40μg庆大霉素的RPMI1640或Eargles MEM中，于37℃下在5％CO_2环境中保温。

E－S抗原的收集

在前24－60小时内，至少更换两次培养基，以确保完全除去宿主成分。一般可在前48小时内更换两次培养基。在囊泡开始外凸之前以一定间隔期收集培养基。实践中最好每24小时收集一次。通过在倒置显微镜下观察囊壁收缩情况以监测囊泡的存活力。第六天后可观察到囊壁外凸。收集培养基后立即以104，000g离心60分钟，以除去不溶性碎片及膜污染物。向上清液内加入对位甲基磺酰氯（2mM）、对氯苯甲酸汞（0.06%）及使pH保持在7－7.4的90%饱和度硫酸铵。于4℃下沉淀，然后以15，000g 4℃离心30分钟收集沉淀物。将沉淀物溶解于50 mM 磷酸钠缓冲液（pH7.4）中并对同种缓冲液广泛透析（48小时，更换几次透析液）。另外可用其他已知方法（如膜过滤法）除去膜碎片。同样也可用其他方法（如超滤法）分离抗原。溶液的UV光谱表明其在278－280nm 有最大吸光率。用Schaffner 和 Weissmann 方法（18）估测蛋白质，可知当寄生虫密度为15囊泡／10 ml 时，蛋白产生量为25－35 μg 蛋白质／囊泡／24小时。

用考马斯亮兰染色、显示这些蛋白质的SDS－聚丙烯酰胺凝胶电泳结果。

图2：在7.5－15%梯度SDS－PAGE上分析考马斯兰染色的E－S蛋白质。泳道1：高分子量标志（116，97.4，66.45和29KD）；泳道2和3：硫酸铵沉淀的两份E－S蛋白质制剂；泳道4：低分子量标志（94，67，43，30，20.1和14.4KD）。

看到的主要蛋白带是表观分子量为大约97000、66000、

50000、38000、28000道尔顿和一个表观分子量范围为10000－14000道尔顿的未分辨的蛋白质混合物。另外还看到许多小带。

E－S蛋白质从头合成的证据:

在培养基中培养48小时后，将囊泡移入含 40μCi ^{35}S－蛋氨酸/囊泡的无蛋氨酸培养基中。于不同时间分别收取囊泡和培养基。将囊泡切割成囊壁和头节并匀浆。在12%SDS－PAGE上分析匀浆液并作荧光光谱分析。用丙酮沉淀培养基并在12%SDS－PAGE上分析，然后进行荧光光谱分析。可见到^{35}S－蛋氨酸掺入到囊壁和头节蛋白质中。

48小时后培养基中出现了几种蛋白质。

图3: 3份囊泡分别在各含40μCi ^{35}S－蛋氨酸的培养基(1ml)中保温48小时，然后用放射自显影法检测^{35}S－蛋氨酸标记的分泌蛋白质。收集培养基，超离心并用丙酮沉淀上清液。每泳道代表1份囊泡蛋白质。

由图3可以看出，几种蛋白质都是作为寄生虫代谢活动的一部分，主动合成并排泄/分泌到培养基中的。

当囊泡于体外被维持在无血清培养基中时，作为代谢更新活动的一部分，某些蛋白质抗原即通过排泄或分泌过程出现于培养基中。在头节外凸之前收集的抗原代表了幼虫阶段的抗原。权利要求了这些抗原、其制备方法、它们在NCC的诊断及可能预后中的应用，以及它们在生产抗猪囊尾蚴感染之疫苗中的应用。本文描述的诊断方法也可用于诊断肉 猪的囊尾蚴病。

其修饰形式可以是聚乙二醇联接、或与其他蛋白质或双功能试剂

交联，或用蛋白酶消化的。本发明还涉及诊断人NCC的方法，该方法包括使被诊断者的CSF与至少一种以SDS－PAGE法测定表观分子量约为97，000或66，000或50，000或38，000道尔顿的体外维持之猪囊尾蚴的排泄或分泌抗原或其混合反应。

实施例

实施例1和2涉及这些抗原在ELISA系统中，检测各种神经系统疾病之病人CSF中抗囊尾蚴抗体的应用。实施例3和4涉及进一步用病人CSF进行免疫沉淀，以根据其分子量鉴定重要抗原。

实施例1

按所述方法收集的排泄／分泌蛋白质以5μg蛋白／ml（100μl／小井）的浓度，在Dynatech 96小井微量滴定板上室温包被过夜。使用2%牛血清白蛋白（BSA）（溶于PBS中）封闭平板上余留的蛋白结合位点。在含有0.05%吐温20的磷酸盐缓冲盐水（PBST）中以1／25、1／125和1／625倍稀释CSF，并于37℃下保温2小时。保温后各小井用PBST洗3次。加入100μl／小井在PBST中以1：1000倍稀释的兔抗人IgG过氧化物酶结合物并于37℃保温2小时；然后用PBST将小井洗3次。使用邻苯二胺作着色剂（4mg／10ml），H_2O_2作底物。于20分钟之内显示已结合的上述结合物。加入50μl 4N H_2SO_4终止反应，并用Dynatech MR 700型ELISA计数仪测定490nm吸光率。在CSF稀释度为1／100时吸光率大于0.10即认为是阳性。

结果如表2中所示。

表　2

诊　断	样本数	阳性
囊尾蚴病		
尸检证实	2	1
外科证实	2	2
临床可疑	7	6
日本脑炎		
IgG 俘获ELISA阳性	30	0
结核性脑膜炎		
培养物证实+外科证实	25	0
结核性脑膜炎		
（抗原阳性或抗体阳性）	71	2（490nm吸光率＝0.15）

从上表可以看出，这种抗原优于粗抗原，并可提高免疫反应的特异性。

实施例 2

该实施例描述了对排泄—分泌抗原之诊断价值的双盲研究，其中试验的设计排除了研究者的主观偏见。

由确定诊断的各种神经病病人得到37份CSF样品，并由研究人员以外的观察者给出1—37的序号。将样品分为3组。由两不同的实验室各出两个人（共4个人）按实施例1所述独立地进行ELISA试验。四个试验者均将结果列成表并交给无关观察者。最后四个人的结果都相同（见表3）。

表　3

诊　断	样本数	阳性
神经性囊尾蚴病	3	3
脊髓麻醉（正常对照）	8	0
手术后脑膜炎（培养证实）	5	0
日本脑炎	7	0
脓性脑膜炎（肺炎球菌性）	3	0
隐球菌脑膜炎（培养证实）	1	0
结核性脑膜炎（培养证实）	2	0
胸段脊髓受压	2	0
颅脊椎接合异常	1	0
椎间盘脱出	1	0
运动神经元疾病	1	0
共济失调性神经病	1	0
偏瘫	1	0
假延髓性麻痹	1	0

上述结果表明，排泄—分泌的抗原可为用于检测病人ＣＳＦ中抗体的诊断试验提供１００％的敏感性和１００％的特异性。

实施例 3

使用 Iodogen 方法，用^{125}I标记按本发明方法得到的排泄—分泌抗原。将标记的蛋白质与得自神经囊尾蚴病、结核性脑膜炎及各种其他神经病病人的ＣＳＦ一起保温。用兔抗人 IgG 、载体人 IgG

结合免疫复合物并向其中加入２．５％聚乙二醇。在7．５－１５％梯度ＳＤＳ－ＰＡＧＥ上分析沉淀物，并进行放射自显影。

图4：^{125}Ｉ标记的排泄—分泌蛋白质与病人ＣＳＦ之免疫沉淀物的放射自显影。１：3倍稀释的ＣＳＦ（３０μｌ）与Ｅ－Ｓ蛋白（３×１０ｃｐｍ）保温并按已述方法沉淀免疫复合物。泳道1：对照，无ＣＳＦ；泳道2、3和4：ＣＳＦ得自神经囊尾蚴病病人；泳道5：ＣＳＦ得自结核性脑膜炎病人；泳道6、7和8：ＣＳＦ得自其他神经病病人。

结果可见，表观分子量约为９７、６６、５０和３８ＫＤ的蛋白质被结合到免疫沉淀物中。

实施例4：

通过在含有^{35}Ｓ－蛋氨酸的无蛋氨酸培养基中维持囊泡从而用^{35}Ｓ－蛋氨酸标记蛋白质，然后按实施例2所述用ＣＳＦ抗体进行免疫沉淀。图5中显示了免疫沉淀物之ＳＤＳ－ＰＡＧＥ带的荧光图谱。

^{35}S标记的E-S蛋白质与各种神经病病人CSF之免疫沉淀物的放射自显影。泳道9和5：NCC病人的CSF免疫沉淀物。

同实施例3一样，本实验中也沉淀出96、66和50KD的蛋白质。

表观分子量为９７０００道尔顿之抗原的特性：

Ｉ，部分核酸顺序：

从猪囊尾蚴的总ｐｏｌｙ Ａ＋ＲＮＡ构建λｇｔ１１ｃＤＮＡ文库（１９）。使用抗由罗化裂体吸虫（Schistosoma mansoni）纯化之副肌浆球蛋白的超免疫兔血清，鉴定并分离一个大约为２．５Ｋｂ的ｃＤＮＡ克隆。

测定双股ＤＮＡ顺序如下：

1. TCTCAAGCAGXACGTCACACTGACAGTACATATGTACACTGA
CTCTGCTTCACATATTATATTAGTTACTAGCAAGCACACACA
CGTCGAC

2. TGAGTACGTCXTGTAGTCTGTCGTATGTGTGTAGTTCTGTCG
TXGATCACTAACTTAATATTAGAGTCAGXAGGTCAGTGTCAT
GTCATGTCATGTAT

Ⅱ. 部分氨基酸顺序:

电泳分离E－S抗原，由考马斯兰染色的SDS聚丙烯酰胺凝胶上电洗脱出表观分子量约为97,000的抗原（21）。溶剂沉淀电洗脱的蛋白质，除去SDS。然后用TPCK处理的胰蛋白酶消化该蛋白质。在用溶剂A（溶于水中的0.1%TFA）平衡过的RP300（C8）柱（0.46×25㎝）上分离胰蛋白酶解肽。用线性梯度溶剂B（含有0.085%TFA的70%乙腈；由0至65%）在40分钟内洗脱肽。于真空下将含肽部分蒸发至干，并进行肽的顺序分析。

由表观分子量97,000之抗原得到的少数胰蛋白酶解肽的氨基酸顺序如表4所示。

表　4

氨基酸顺序	肽
……VKLDSAK	T14
ATQTEvWR	T19
VYSTSTK	T16
YAFL—ASVT—Sh	T21
SLLDFRSTR	T11

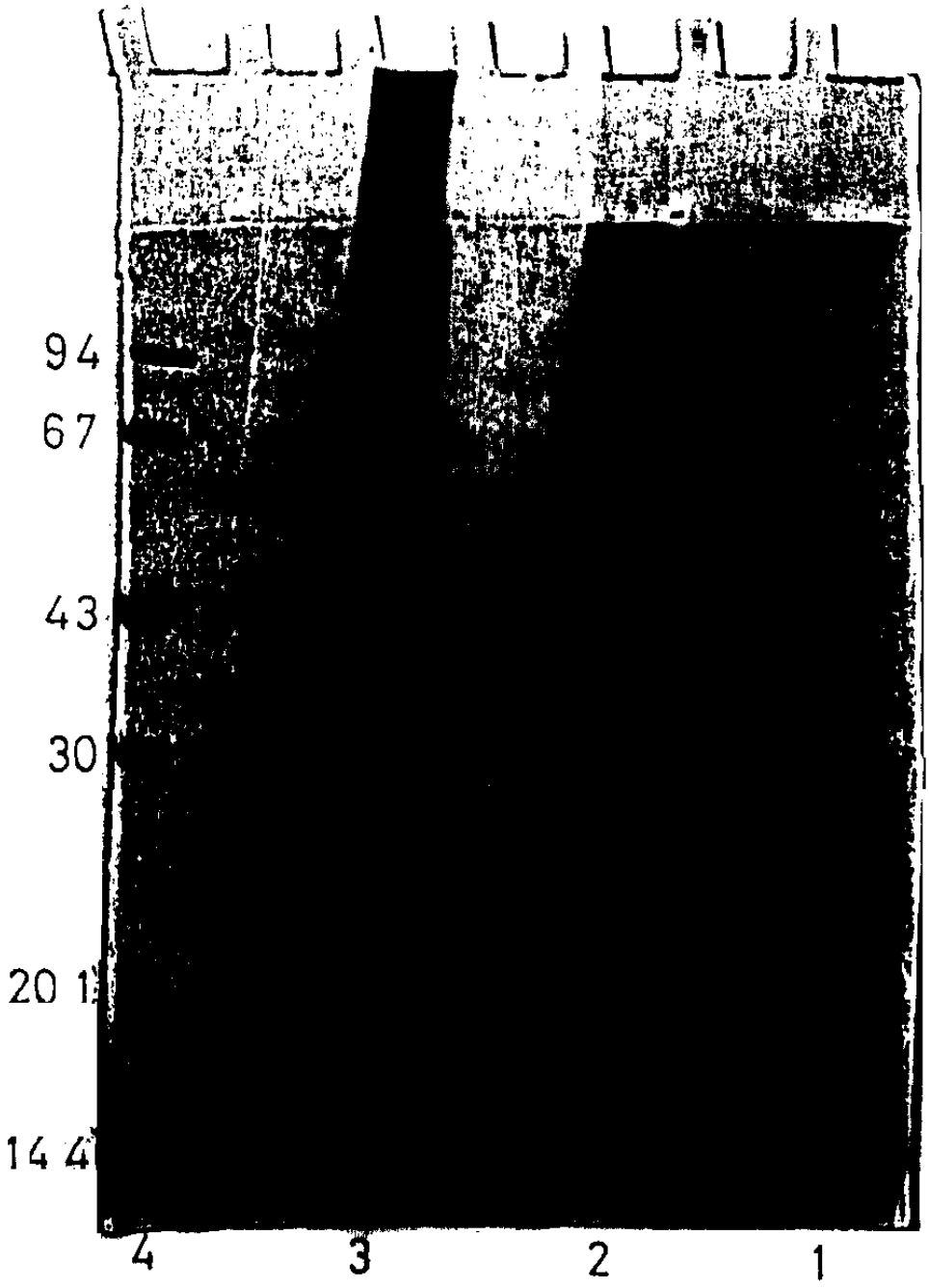


图　1

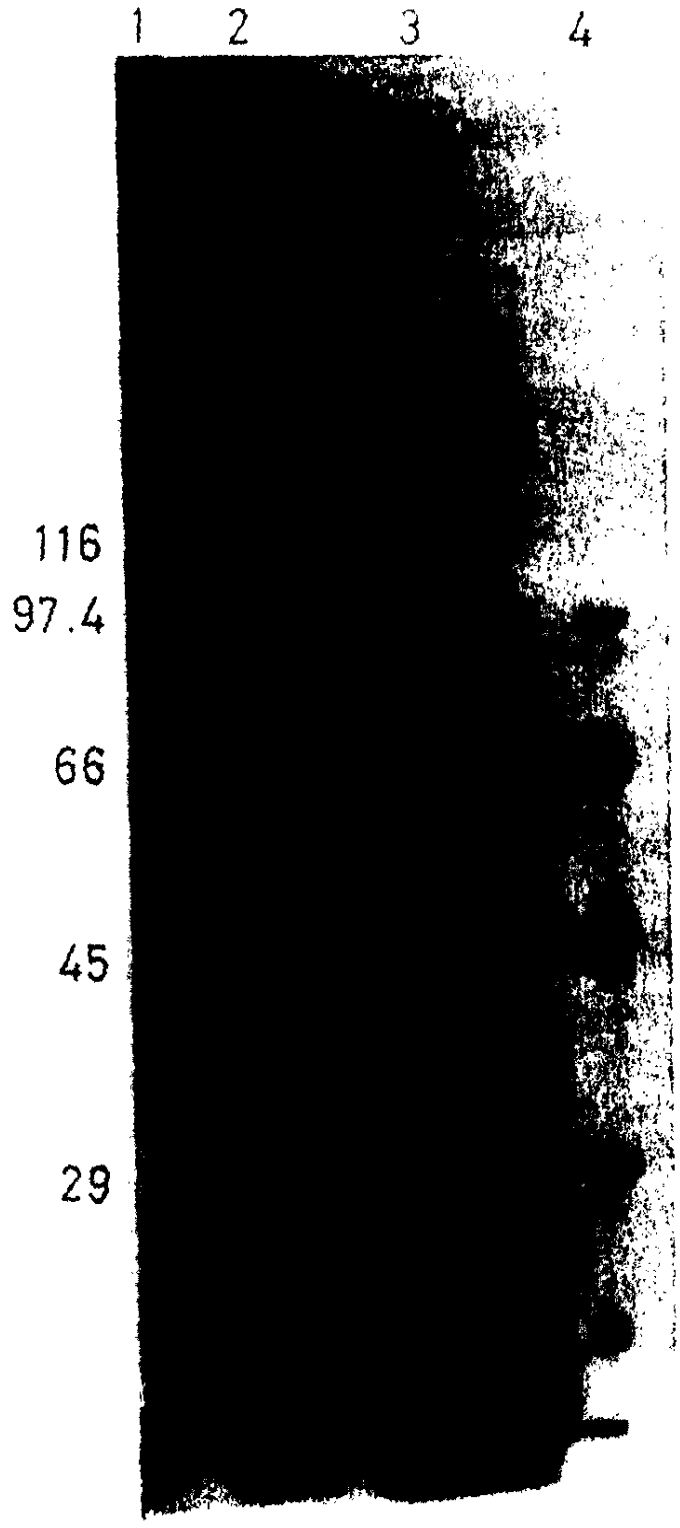


图 2

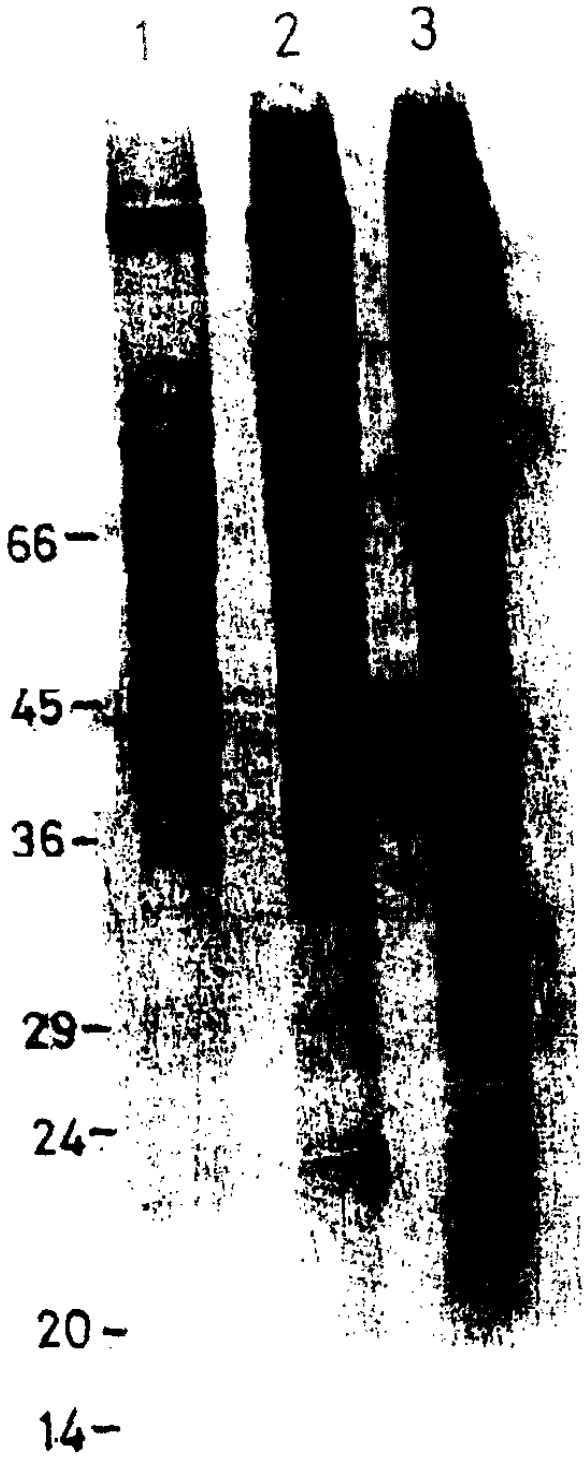


图 3

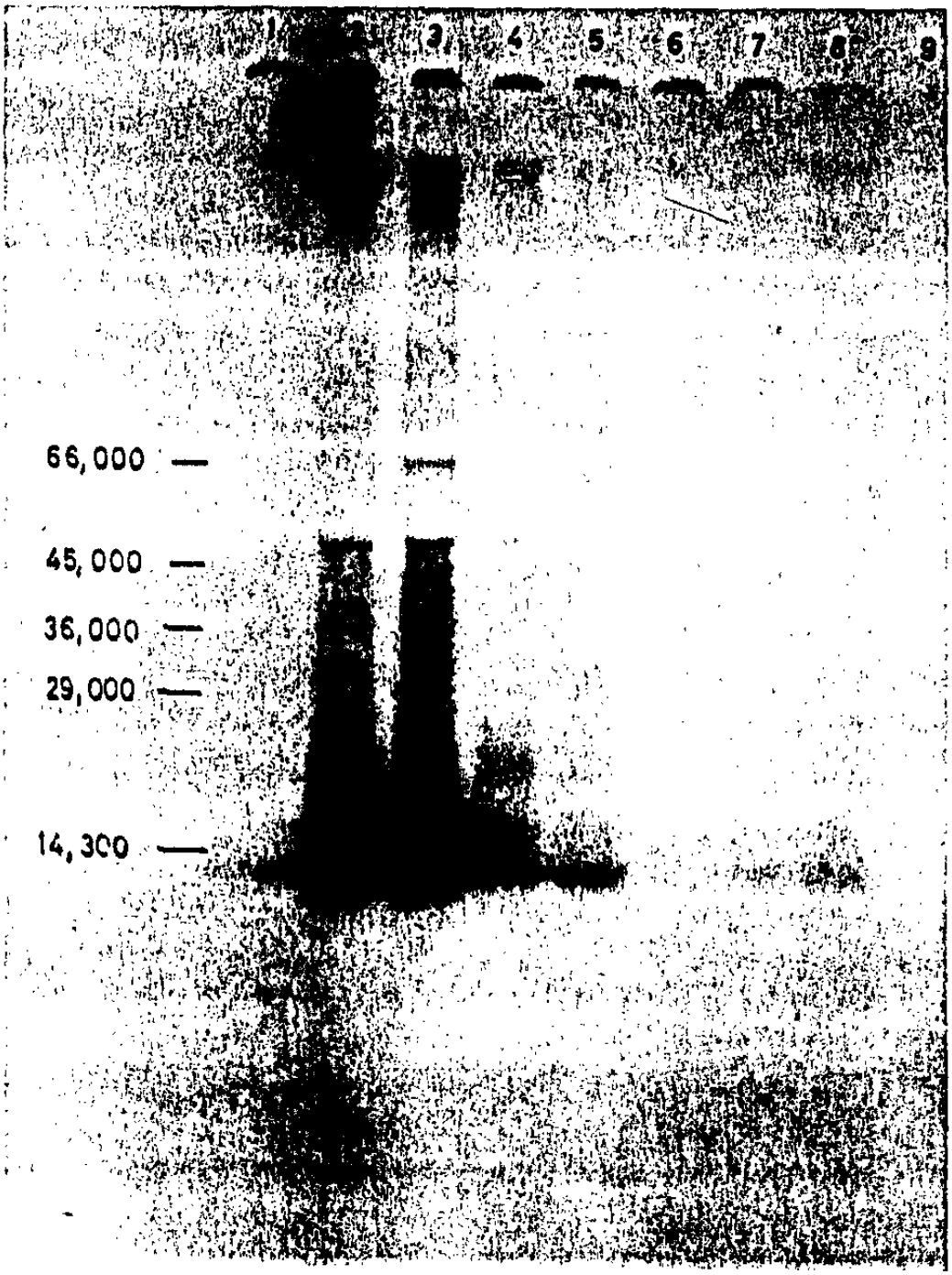


图 4

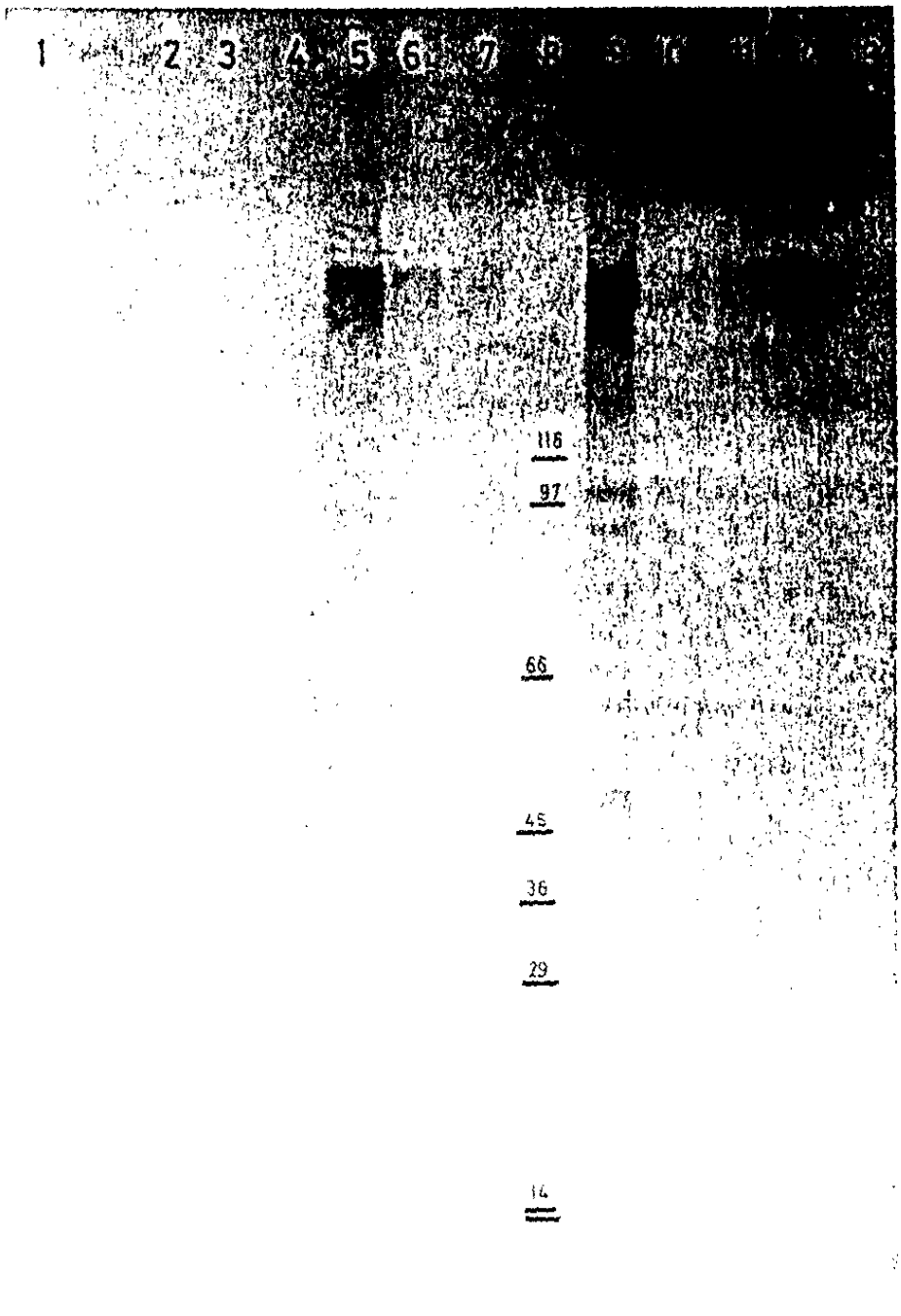


图 5