



[12] 发明专利申请公开说明书

[11] CN 86 1 05669 A

[43] 公开日 1987年3月4日

[21] 申请号 86 1 05669

[22] 申请日 86.7.3

[30] 优先权

[32] 85.7.3 [33] 澳大利亚 [31] PH 01310

[71] 申请人 库珀斯动物卫生澳大利亚有限公司

地址 澳大利亚新南威尔士州北赖德埃平路
71号

[72] 发明人 约翰娜·帕特里夏·奥普德比克

[74] 专利代理机构 中国专利代理有限公司

代理人 王 巍

[54] 发明名称 蜱疫苗

[57] 摘要

控制蜱对温血动物的侵染, 包括用含有由蜱集合神经节得到的抗原物质的疫苗处理所说的温血动物。蜱抗原物质是将蜱幼虫粗提物通过亲和层析制得的。

权 利 要 求 书

1. 一种包含得自蜚之集合神经节的抗原物质的抗原组合物。
2. 根据权利要求1的组合物，其中含集合神经节的抗原物质是由蜚幼虫得到的。
3. 根据权利要求1或2的组合物，其进一步包含由蜚之消化道得到的抗原物质。
4. 根据前述权利要求中任一项的组合物，其中抗原物质业经亲合层析基质纯化，所说的亲合层析基质已结合有抗蜚抗原物质的抗体。
5. 根据前述权利要求中任一项的组合物，其中蜚是微小牛蜚 (*Boophilus microplus*)
6. 根据前述权利要求中任一项的组合物，其进一步含有一种皂甙作为佐剂。
7. 一种包含由蜚幼虫得到的抗原物质的抗原组合物。
8. 根据权利要求7的组合物，其中抗原物质是由蜚的集合神经节和消化道得到的。
9. 根据权利要求7或8的组合物，其中抗原物质是业已通过一亲合层析基质纯化的，所说的亲合层析基质上已结合有抗蜚抗原物质的抗体。
10. 根据权利要求7、8或9的组合物，其中蜚是微小牛蜚 (*Boophilus microplus*)。
11. 根据权利要求7至10中任一项的组合物，其进一步包含一种皂甙作为佐剂。
12. 一种包含由蜚得到的抗原物质以及一种作为疫苗佐剂的皂甙的疫苗。

1 3 根据权利要求 1 2 的疫苗，其中抗原物质是由蜱的集合神经和消化道得到的。

1 4 根据权利要求 1 2 或 1 3 的疫苗，其中抗原物质业已通过亲合层析基质被纯化。所说的基质上已结合了抗蜱抗原物质的抗体。

1 5 根据权利要求 1 2、1 3 或 1 4 的疫苗，其中蜱是微小牛蜱 (*Boophilus microplus*)

1 6 根据权利要求 1 2 至 1 5 中任一项的疫苗，其中抗原物质是由蜱幼虫得到的。

1 7 一种生产由蜱得到的纯化的抗原物质的方法，其包括：

(1) 制备一个已将抗蜱抗原物质之抗体结合于其上的亲合层析基质；

(2) 使蜱的粗提物通过该基质，以在基质上吸附蜱抗原；

(3) 从基质上洗脱纯化的抗原物质。

1 8 根据权利要求 1 7 的方法，其中蜱粗提物是由蜱幼虫得到的。

1 9 根据权利要求 1 7 或 1 8 的方法，其中结合到亲合层析基质上的抗体是由已经成功地进行了抗蜱免疫之动物的血清得到的。

2 0 根据权利要求 1 7、1 8 或 1 9 的方法，其中结合到亲合层析基质的抗体是由蜱抗原物质产生的单克隆抗体。

2 1 一种控制温血动物的蜱侵染的方法，它包括用一种根据权利要求 1 至 1 6 中任一项的抗原组合物或疫苗对动物进行免疫。

蜚 疫 苗

本发明涉及抗原组合物，特别是涉及用于控制动物身上蜚侵染的疫苗。

在许多国家，控制动物、特别是牛身上的蜚侵染具有十分重要的经济意义。即使轻度侵染也可造成肉类和牛奶产量降低及兽皮损坏，而对于较重的侵染则必须除去蜚，以避免牛的死亡。蜚还是传病媒介，例如它可携带能导致“蜚热”爆发的巴贝氏梨浆虫。

传统的控制方法包括用各种化学物质喷洒和浸泡，如用 D D T、氯化烃、氨基甲酸酯、有机磷酸盐、拟除虫菊酯及脘等类化学物质。这些化学物质中大多数都只具有有限的商品使用期限，因为会出现各种具有抗药性的蜚。某些情况下，可通过增加喷洒和浸泡液中化学物质的浓度，来扩大特定化学物质的可用性，但这样一来便增加了成本，并常可在牛身上具有毒性综合症。一般喷洒和浸泡处理需要每三至四周重复一次，并且要付出额外一些繁重劳动，包括集中动物及将其拉入或引出浸泡或喷药地点。

另外还有一些与使用这些化学物质有关的困难。将化学物质用于地上一个混凝土的浸泡缸中时，即可有牛的粪尿引起的很大程度的污染，从而导致化学物质分解，进而造成额外的损失，并且需要定期进行化学分析，以监测活性成分的水平。需要定期打扫浸泡缸而使得工人会接触到有潜在危害的化学物质。再者，尚须小心处理浸泡液以避免危害环境。

使用化学物质的再一个困难是为了消灭新出现的抗药性蜚而寻找

新的有效化学物质的工作越来越难了。这一困难的部分原因是因为很少的化学物质残留在宿主动物的肉和奶中，而又希望这些残留物不会对肉、奶的消费者造成危害。

因此近几十年来，人们一直盼望着找出可替代的安全而有效的控制牛的蜱侵染的方法。畜牧管理方法如牧场轮换产生有限的效果，并且在大多数情况下不是很容易就能得到所需要的场地的。繁殖抗蜱牛的尝试已搞了许多年，但成就不大。在某些地区还开展灭蜱运动并取得有限的成功，但花费很大，在很大区域中灭蜱也是不实际的。

现在，我们已发现了一种有效地控制蜱的方法，它不需要使用危险的化学物质，并且单独一次处理可长期有效，故不必要定期集合动物。该方法依靠动物的免疫系统来阻止蜱在动物身上存活或发育。

使用控制牛蜱的抗性牛已作为用化学物质控制蜱的一种辅助方法提出。在产生抗性之前，一般需经蜱侵染的刺激，这种刺激是“获得性”的，并且推测是免疫学机制介导的。然而每只牛身上所产生的抗性程度是一种根据动物的种属而有很大变异的遗传特性。有些种，例如 Zebu 种和部分 Zebu 种杂交种可产生高水平抗性。而其它的，例如英国种则保有很大程度的敏感性。尽管进行了广泛的选择性繁殖，但这种天然抗性尚不能成为化学物质控制蜱的一种令人满意的可替代的或辅助的方法。

已有人提出了发展蜱疫苗的可能性。研究工作者们已使用了全蜱匀浆，唾液抗原，消化道相关抗原以及某些纯化的蛋白质或酶〔见 Allen 和 Humphries, *Nature*(1979)280, 491-493〕，且有些产生了重要的、但与化学控制方法比较仍显得不足的免疫性。已对这种有限的成功作了各种实验解释。例如，不能期望疫苗产生比先天获得性抗性（其为有关动物种的特性）的更大的抗性。全蜱匀浆

包含有免疫抑制成分，以及只有纯化的抗原是不够的，而需与其它抗原协同作用。

澳大利亚专利说明书 45936 号 (1985) 公开了一种通过纯化全蜚粗提取物制备蜚抗原的方法，但其所报告的有用抗原分离物的水平很低。

本发明的给牛注射抗牛蜚疫苗的方法，可使只有很小程度天然抗性为特征的本地种牛产生高的、可长期维持的抗性水平。由于该疫苗的效能而使其成为一种替代化学控制的十分令人满意的控制方法，而且具有不需频繁治疗的优点。

据此，我们提供了一种包括由蜚的集合神经节 (Synganglion) 得到之抗原物质的抗原组合物。

已发现得自集合神经节 (即蜚的中枢神经系统) 的抗原物质可增大并改善由其它抗原——如由蜚消化道制得的抗原的保护作用。虽然我们并不太希望由于讨论我们发明的可能基础而受限制，但很可能在全蜚体内存在着干扰有效的免疫反应、而反过来又受集合神经抗原刺激的物质。因此，在本发明的另一个实施方案中我们提供了一种含有得自蜚的集合神经节和消化道之抗原的混合物。

本发明的另一个方面，我们提供了一种由成令蜚的集合神经节或其它神经组织得到的抗原制成的，可保护温血动物免受蜚侵染的疫苗。将解剖出的组织制成匀浆，以超声波处理并离心。所得抗原混合物包含水溶性物质以及颗粒物。我们已发现颗粒部分具有更强的抗原性。

本发明的一个优选方面是，抗原性物质是由幼蜚得到的。这种方法的优点在于，与稚虫或成虫比较，幼蜚的集合神经节占体重的较高比例。可用磨碎或匀浆或其它破坏蜚虫体方法处理幼蜚，之后用适当的含水介质提取，用适当的方法如，亲合层析、凝胶渗透层析，离子

交换层析，疏水性凝胶层析、电泳，聚胶电泳选择性沉淀等方法分离，最后浓缩得到富含抗原成分的抗原物质。

在本发明的另一实施方案中，抗原物质是在蜚胚中抗原物质最初合成时，破坏发育中的蜚卵制得的。

亦可在适当的宿主生物体，包括细菌，酵母和其他微生物，以及培养的哺乳动物细胞中通过克隆和表达蜚的遗传物质得到这些抗原物质。

在本发明的进一步的实施方案中，以集合神经节为特征的抗原物质是经体外培养蜚细胞或与其它动物细胞杂交的蜚细胞制得的。

在本发明的进一步的实施方案中，抗原物质——包括但不限于以含集合神经节为特征的抗原物质，是通过亲和层析或免疫沉淀，或者使用业经蜚抗原物质成功地免疫的温血动物的血清抗体、或者使用可与蜚抗原物质特异结合的单克隆抗体制得的。

在本发明的进一步实施方案中，抗原物质是通过其结合于固定化的配体制得的，这些配体则是与神经系统的已知功能分子——如神经递质分子，或神经系统特异的生长因子，或其各自的衍生物相关联的。

在本发明的更进一步的实施方案中，是将得自其它蜚组织的免疫抑制成分失活，之后加到抗原混合物中，以引起抗抑制反应。

将抗原物质与一种或多种本领域内普通技术人员已知的佐剂结合，如皂~~素~~（或衍生物，或相关物质），胞壁酰基二~~肽~~、海藻糖霉菌酸酯、弗氏完全佐剂，弗氏不完全佐剂、其它油包水型乳剂、双重乳剂、葡聚糖、二乙氨基乙基——葡聚糖、明矾、磷酸铝、氢氧化铝、皂土、酵母聚糖、聚电解质、松香油、磷酸钙、鱼精蛋白、肌氨酸、甘油、山梨醇、丙二醇、可依其注册商标“Carbopol”购得的羧乙烯基聚基

合物、不挥发油类以及较高级脂肪酸的合成脂。已发现皂甙是特别有效的佐剂。

可用一种适当的防腐剂处理抗原物质，如用苯酚、“Phenonip”、甲醛、丙二醇、甘油、对羟苯甲酸脂，苯甲酸和其钠盐，六氯酚、季铵杀菌剂、叠氮钠以及乙基汞硫代水杨酸钠（或以其注册商标“Merthiolate”（硫柳汞）可购得的形式）。

在配制之前或配制以后，可将抗原物质经过滤，照射或化学处理进行灭菌。

可将抗原物质与适当载体进行化学或物理连接，如与胶乳颗粒，免疫源性大分子，琼脂糖微球等连接，或者可以配制成为与牛或其他动物抗体复合的抗原。

亦可用一种适当的抑制剂、调节剂、交联剂或变性剂，或加热或照射方法处理抗原物质以便保持或提高其免疫源效力。

亦可将抗原物质与其它治疗剂，例如驱蠕虫剂、驱吸血虫剂及其它疫苗结合使用，驱蠕虫剂如左旋咪唑或其治疗上可接受的盐，疫苗如梭状芽胞杆菌疫苗。

亦可将抗原物质与免疫刺激剂，如左旋咪唑，bortatin、tuftsin、植物血凝素、细菌脂多糖、多核苷酸、双二乙氧乙基芴酮、香菇糖、异丙肌苷、溶血卵磷脂等，或者与免疫调节激素如白细胞间素、Leukotrienes 等，或与天然转移因子的组合物联合使用。

可将抗原物质冻干或干燥或浓缩，使用前用一种适当的液体介质（如灭菌盐水）重新配成需要的浓度，必要时可加入一种或多种佐剂或上面提到的其它附加物质。

用所述的任一种方法配制的抗原物质在下文中称为疫苗。

动物所用疫苗的量应根据动物体重及抗原物质特殊制剂的相对活性确定。足够保护动物的抗原配制的疫苗，较好是含疫苗体积为 1 至 10 毫升，更好含有 1 至 5 毫升。所需要的抗原物质的量是很小的，含有不大于 2 毫升蛋白（用于牛较好是 10——1000 微克，更好是 50——500 微克）的抗原物质的典型样品足以有效地免疫动物，以抵抗蜱的侵染。对于其他动物，如狗或家禽则使用相对较小的剂量。

疫苗的优选给药方式是经胃肠道外。这里所用的“胃肠道外”这个术语是指静脉内，肌肉内、皮内及皮下注射。最方便的给药方法是肌肉内注射。可使用对牛作其它治疗应用的常规注射枪。

该疫苗可用于控制、消除或防止各种蜱的侵染，包括牛蜱属、扁头蜱属、硬蜱属、玻眼蜱属、花蜱属、革蜱属及血蜱属的侵染。

亦可将该疫苗装入特殊装置内，植入或接触于动物的某一部位，以缓释或可控释放的形式给药。

由本发明提供的控制蜱的新方法具有许多优点。如上所述，本发明的方法可避免使用有害的化学物质，因而避免了维护和清洗浸泡缸及喷洒装置的困难，此外尚有其他一些优点。

其它优点包括容易进行控制蜱与其它治疗的联合处理、节省给药所需要的劳动强度，消除了毒性杀昆虫剂扩散到环境中去的危害、防止抗药性蜱种的产生以及具有长时期保护作用等。这一长保护期对于减小定期处理是有利的，而且因为动物在每一个新的蜱滋生季节开始时即受保护，这时牧场中蜱的数目很少并很可能被忽略，故有一长保护期也是有利的。在绝大多数情况下，接种疫苗的动物均可足在全年内免受蜱的侵染。

疫苗的作用不仅能减少被侵染牛身上蜱的产生，而且也降低存活蜱的生命力和繁殖力，从而产生很少的卵，且总的成活力很低。这一现象便有力地证明了进行广泛的疫苗接种在降低蜱对牧场的污染中所起的作用。

对于牛蜱侵染来说，微小牛蜱 (*Boophilus microplus*) 在其整个生活周期中只有单一的宿主，延长的保护期也将具有稳定降低牧场中染蜱水平的作用，而且这一作用将会逐年累积。对于多宿主蜱也会出现相似的效果。

下述实施例旨在进一步阐明，而不是限定本发明。

实施例 I

两头以前没有接触过蜱的悔福特牛，接种用蜱成虫（微小牛蜱）的消化道和集合神经节匀浆制得的抗原制剂。将蜱成虫之消化道和集合神经节的匀浆离心得到微粒和水溶性部分。将微粒部分用皂石

(Quil A) 配成悬浮液给药。水溶性部分则用弗氏不完全佐剂乳化，并将此两部分分别在不同部位注射于牛的皮下。在试验的 0 天、14 天和 45 天分三次注射疫苗。可溶性抗原蛋白每次注射 500 微克，微粒抗原蛋白则三天分别注射 350、100 和 100 微克。

在同一时间有一对牛只注射佐剂，而第三对牛则不作处理。

在第 62、69、76、83 和 90 天，每次用 20,000 只幼蜱攻击牛。

计数所有牛身上掉下来的成虫蜱并进行保温，直到产卵结束。并记录大小和外观上不正常的蜱并单独保温。

下表中给出了正常与异常蜱以及产卵的总累积数。与对照牛比较，疫苗接种牛的各统计数字的降低情况如下：

蜚总数	降低85%
正常蜚数	降低96%
卵总数	降低98%
正常蜚的平均重量	降低50%
正常蜚所产卵的平均重量	降低66%

表 1

	蜚 总 数	正常蜚数	卵 (克)
佐 剂 对 照	30,200	25,120	2,239
接种消化道 和集合神经 节疫苗	4,900	910	50

实施例Ⅱ

由亲和层析法由幼蜚匀浆中提取保护性抗原，制备蜚疫苗。

提 纲

A) 抗血清的产生

由成虫蜚解剖出消化道和集合神经节并用这些器官制备疫苗，之后给牛注射

牛已被蜚侵染并表现有强的免疫反应

B) 制备亲和层析柱

由 (A) 所述免疫牛制备血清，由血清中提取抗体并结合于层析

载体上

C) 层析提取抗原

将幼蜱制匀浆并分离成可溶性部分和微颗粒部分；

将这两部分加样于 (B) 步骤中制得的固定化的血清抗体上；

洗脱与固定化抗体结合的抗原并配制成疫苗。

D) 接种

接种了得自 (C) 之抗原的牛产生了显著的抗蜱侵染的免疫力，而在疫苗接种中使用整体幼蜱匀浆则无效

A) 抗血清的产生

收集蜱的器官

由 2 头梅福特牛身上手工收集脱皮的早令成、虫 (生活周期的 14 — 17 天) 雌性蜱 (*Boophilus microplus*) 。将蜱包埋于石腊中并解剖出下列器官：

1. 集合神经节
2. 消化道

将器官在干冰上急速冷冻并储存于 -20°C 备用。

制备抗原

(1) 将消化道悬浮于 PH7.2, 含有 132.5 mM NaCl 和 1mM Na_2EDTA 的 25mM Tris 缓冲液 (抗原缓冲液) 中, 并在手动 Dowsen 匀浆器中制成匀浆。将匀浆液 30 — 60 秒脉冲超声波爆破冲击 10 分钟。之后以 600g 离心 10 分钟。将沉淀的颗粒物在等部分上清液中再次匀浆并依上述条件继续超声处理 5 分钟。合并经过超声处理的制备物并于 15,000g 离心 20 分钟, 之后丢去细胞团块。

将上清液以 $100,000g$ 离心 1 小时。保留如此得到的上清液（可溶性蛋白部分），并将膜的沉淀团块经匀化悬浮于抗原缓冲液内。可溶性部分和膜部分均储存于 -20°C 备用。上述所有步骤均于冰浴中进行。

(2) 将集合神经节用一研棒加压通过一细孔网。将细胞悬液收集于抗原缓冲液内并于 -20°C 冷冻备用。

配制疫苗

将可溶性蛋白部分和细胞悬液加等体积弗氏不完全佐剂乳化。将膜蛋白部分悬浮于含有 1 毫克皂甙 (Quil A) / 毫升的抗原缓冲液中。所有疫苗制剂均于免疫接种的当天配成。

接种疫苗

按表 2 中所列的方案和剂量，使用 18 号针头肌肉内注射疫苗制品。在颈部右侧的中三分之一处接种膜制剂，在颈部左侧的中三分之一处接种可溶性蛋白制剂，而细胞悬液则注射于左右腿的半膜肌和半腱肌的中三分之一内。对照组动物为未接种者或只接受佐剂加盐水者。在实验的第 0、14 和 42 天接种。

血样采集

以规定的间隔期由颈静脉采血；离心收集血清并于 -20°C 保存

攻击试验

使牛接触蜚幼虫（10 天令；每次侵染 20,000 只）即每七天共 5 次将幼蜚放在牛身上进行侵染。收集和计数所有正常和受损的蜚，并确定它们生产的卵和幼虫。

表 2 疫苗接种方案及抗原存在的浓度和方式

疫苗接种分组	时 间 (天 数)					
	0	1 4		4 2		
	抗原	可溶性	膜	可溶性	膜	动物数
1. 消化道及集合神经节	350△	500	100	500	50	2
	500		75		50	
2. 未接种的对照	—	—	—	—	—	2
3. 只给佐剂的对照	—	—	—	—	—	2

* 集合神经节以单细胞悬浮液形式接种

△ 蛋白浓度以微克数计

结 果
表 3

	蜚 数 目			卵重量
	正常的	受损的	总 数	克
未接种的对照组	17380	1599	18988	2276
佐剂对照组	17798	987	18785	1787
集合神经节—— 消化道	820	2240	8060	54

由疫苗产生的百分保护：

正常蜚 9 5 %

总蜚 8 4 %

卵 9 7 %

B) 制备亲合层析柱

于室温下用 5 0 %硫酸铵沉淀采自免疫牛的血清 4 小时。之后对亲合偶联缓冲液：0. 1 M NaHCO_3 ，0.5 M NaCl (PH8.5) 广泛透析。将 1 0 0 毫克免疫球蛋白 (Igs) 偶联于 1 0 毫升溴化氰活化过的葡聚糖 4 B 凝胶上。用 0. 2 M 甘氨酸缓冲液 (PH8.0) 封闭其余反应性部位。偶连并洗涤后，将凝胶装入 1 5 毫升柱。已证明其对蜚高度敏感的对照组动物的正常 Igs，也被偶联于凝胶上，并按前述方法制备层析柱。此外，用 0. 2 M 甘氨酸缓冲液 (PH8.0) 封闭活化的葡聚糖 4 B 凝胶，并用于控制蛋白质在凝胶上的非特异性吸附。

C) 层析提取抗原

由一组雌性蜚收集在其 7 天产卵期间产出的大量卵 (1 0 —— 1 0 0 克) 并在容器内孵化。将 1 0 天令的幼虫冷冻 1 小时，从卵碎

屑分离并按前述方法提取消化道疫苗（见A）。

在亲合缓冲液（PBS，PH7.4）内透析抗原并将50毫克抗原蛋白加样于已装好的亲和层析柱。使抗原在柱上保温30分钟，之后用PBS（PH7.4）以20毫升/小时的流速彻底洗柱，直到280nm处重新出现基线O.D.读数。再以甘氨酸缓冲液（0.1M，PH2.8）上柱，收集各管，直到测得的O.D.读数再次出现基线水平。将层析柱储存于含有叠氮钠的Tris缓冲液中，第二天用高和低PH缓冲液循环再生

以这种方法分别层析由幼蟀匀浆制得的微粒和可溶性部分。首先用Triton X——100处理微粒部分，但不离心。可溶物质和微粒物质是相继按类一同被洗脱的。

D）对牛的疫苗接种

按配制消化道抗原（见上述（A））的方法配制经过亲合层析的幼虫抗原，于第0、28、和42天以每头动物500微克蛋白的总量给牛注射。

结果

表 4

疫 苗 组	百 分 保 护	
	（总 蟀）	（卵）
全幼虫均浆 （可溶性+微颗粒）	16%	25%
全幼虫匀浆经亲合纯化部分 （可溶性+微颗粒）	65%	84%

实施例Ⅲ

基于解剖出的蜱器官所制疫苗的效力

方法

按实施例Ⅱ（A）所述方法，由成虫蜱解剖出消化道和集合神经节。

制备疫苗并按实施例Ⅱ（D）和表5中所列述的方法，将消化道制剂（可溶性和微颗粒部分）或集合神经节（细胞悬浮液）或两者一起注射于被试牛。

用蜱侵染牛并按实施例Ⅱ（A）所述方法确定免疫性

结果

（a）在实验的第56天开始的对连续3周攻击的百分保护：

	总 蜱	卵
集合神经节加消化道	79 %	91 %
只用消化道抗原	88 %	96 %

（b）在第一次疫苗接种后约6个月时对自然侵染的百分保护：

集合神经节加消化道	65 %（蜱）
只用消化道抗原	〔-20 %〕

可见，虽然在第56天时由使用集合神经节加消化道抗原所产生的保护与单独使用消化道的差不多，但在六个月的长期保护作用却显著高于只用消化道抗原。

这些结果更详细地在图1中表明。

图1是由两组疫苗接种牛身上掉下的蜱的累积数与由对照牛身上掉下的积累蜱数的比例。

组1是用得自集合神经节及消化道的抗原作疫苗接种的。组2是

用只由消化道提取的抗原作疫苗接种的。以 20,000 个微小牛蜱幼虫“脉冲”侵染两个疫苗接种组及对照组动物，以检定免疫性（百分保护）水平；同时也通过蜱侵染之牧场的自然侵染情况检定。

结果表明，对于“脉冲”和自然蜱攻击来说，组 1（集合神经节加消化道）相对于组 2（只用消化道）提高了长期保护作用。在对照组也表现有某种程度的自然免疫力。

表 5 实施例Ⅲ 中给动物接种的疫苗

动物	抗 原								
	消化道膜			消化道上清液			集合神经节		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
27, 28	350	100	50	500	500	500	—	—	—
29, 30									
31, 32	350	100	50	500	500	500	500	75	50
33, 34									
35									
36, 37	—	—	—	—	—	—	—	—	—
38, 39									
40(对照组)									

勘 误 表

文件名称	页	行	补 正 前	补 正 后
说 明 书	2	1 3	这种刺激	这种抗性
	3	倒 3	与稚虫	与幼虫
	4	倒 5	海藻糖霉菌酸酯、	海藻糖二霉菌酸酯、
		倒 1	基聚基	基聚
	5	4	六氯酚	六氯苯
		5	} 叠氮钠	叠氮化钠
	1 3	7		
	6	5	2 毫升	2 毫克
	7	1 1	} 悔福特牛	海福特牛
	9	1 1		
		6	D) 接种	D) 牛的接种
		1 1	脱皮的早令成虫	蛻皮的早令成虫
		倒 1	丢去细胞	弃去细胞
	8	倒 8	由亲合	用亲合
	1 0	2	匀化悬浮	匀化再悬浮
		1 3	品。	剂。
		1 4	左右腿	左后腿
	1 2	倒 9-8	葡聚糖	琼脂糖
		倒 5	葡聚糖	琼脂糖
	1 3	8	再生	再生。
		倒 4	全幼虫均浆	全幼虫匀浆

勘 误 表

文件名称	页	行	补 正 前	补 正 后
权利要求书	1	7	抗 蜂 抗原物质	蜂 抗原物质
		倒8		
	2	4		
		10		

图 1

