



40225

鏈霉菌的噬菌体

方 中 达 著

科 学 出 版 社

鏈霉菌的噬菌體

方中達著

科學出版社

1957年8月

內 容 提 要

鏈霉菌噬菌體的發現已經有十年的歷史。噬菌體的研究在理論和生產實踐上都有很大的意義。本書敘述鏈霉菌噬菌體的形態和結構，繁殖的規律，遺傳和變異，環境因子的影響，噬菌體和寄主的关系以及寄主在噬菌體影響下發生的改變等問題。最後，說明了目前在生產上解決鏈霉菌噬菌體問題的途徑。有關鏈霉菌噬菌體的研究方法，也作了適當的介紹。本書內容雖然是以鏈霉菌的噬菌體為主，但是為了說明問題起見，也引証了一些細菌噬菌體方面的研究資料。

鏈 霉 菌 的 噬 菌 體

方 中 達 著

*

科學出版社出版(北京朝陽門大街 117 號)

北京市書刊出版業營業許可証出字第 061 號

上海中科藝文聯合印刷廠印刷 新華書店總經售

*

1957 年 8 月 第 一 版 書 號: 0857 印 張: 2 5/16

1957 年 8 月 第一次印刷 開 本: 850×1168 1/32

(滬) 0001-1,956 字 數: 53,000

定價: (10) 0.46 元

前 言

噬菌体的發現已經有四十年的歷史。1940 年以后,噬菌体的研究有很大的發展。对于病毒的本質和起源、病毒和寄主細胞的关系、微生物的遺傳和變異以及有生命物質的起源等基本問題的研究,噬菌体証明是最有利的工具。

1947 年在鏈霉菌上發現了噬菌体。目前,在世界各國,噬菌体是鏈霉素生產上的重要問題。这本小冊子主要是以鏈霉菌噬菌体的研究結果为主,說明噬菌体的一般生物学特性,同时也指出噬菌体問題在鏈霉素生產上的意义和防治的途徑。鏈霉菌噬菌体的性狀和細菌的噬菌体沒有基本的差別。由于鏈霉菌噬菌体的發現較迟,有关这方面的研究較少,为了說明問題起見,也引証了一些有关細菌噬菌体的研究資料。

放綫菌的分类很不一致,命名也就不同。書中有关放綫菌的学名,还是保持原著所用的名称,而不求統一。

噬菌体的文献很多, Luria 所著的“General Virology”(1953) 和 Раутенштейн 寫的小冊子“Бактериофагия”(1955),有較詳細的敘述。

目 錄

前言	i
第一章 緒論	1
噬菌体的發現	1
放綫菌的噬菌体	2
第二章 噬菌体的形态和結構	6
噬菌体的形态	6
噬菌体的化学成分	10
噬菌体的抗原性	11
第三章 噬菌体和鏈霉菌的关系	14
放綫菌的自溶現象	14
鏈霉菌的溶菌現象	16
溶菌性	19
第四章 鏈霉菌噬菌体的繁殖	23
噬菌体繁殖的一般規律	23
鏈霉菌噬菌体的繁殖	29
鏈霉菌噬菌体的定量	32
第五章 鏈霉菌噬菌体对环境的抵抗性	36
物理和化学因子的影响	36
鏈霉菌噬菌体的保存	41
第六章 噬菌体的变異	43
鏈霉菌噬菌体的变異	43
鏈霉菌噬菌体变異的原因	48
第七章 鏈霉菌在噬菌体影响下的改变	50
抗噬菌体再生菌的分离方法	50

鏈霉菌再生菌的性狀·····	51
鏈霉菌在噬菌体影响下變異的原因·····	55
第八章 鏈霉素生產中的噬菌体問題·····	58
噬菌体對於鏈霉素產量的影响·····	58
鏈霉菌噬菌体的來源·····	59
鏈霉菌噬菌体的防治途徑·····	61
参考文献·····	63

第一章 緒 論

噬菌体的發現

早在40年前,特窩(Twort, 1915)和德勒(d'Hérelle, 1917)几乎是同时發現微生物的溶菌現象。特窩在培养的葡萄球菌(*Staphylococcus*)菌种上,發現透明的溶菌斑。移殖珥在溶菌斑上碰过以后,在培养有同一种細菌的瓊膠培养基平面上塗划,在划过的地方,將來也表現有透明的溶菌斑紋。特窩証明在透明的溶菌斑上產生一种能够穿过細菌濾器的物質,这种物質也可以溶解培养液中的細菌。經過不断的移殖,証明这种物質是可以傳染的。德勒在研究痢疾桿菌(*B. dysenteriae* Shiga)时,亦發現以上溶菌現象。从痢疾病人的排泄物中,尤其是在病人的恢复期,可以分离到一种溶菌性的物質。这种物質經過細菌濾器過濾以后,接种在培养的痢疾桿菌上,可以溶解在肉汁培养液中培养的痢疾桿菌。德勒認為这种溶解細菌的物質是一种很小的超視寄生物。这种寄生物可以侵入細菌,在細胞的内部繁殖,然后破坏和溶解細菌的細胞。德勒并且正式命名这种溶解細菌的物質为噬菌体(Bacteriophage)。由于特窩和德勒二人最早發現的原因,以上溶菌現象一般也称为“特窩-德勒現象”。

微生物的噬菌体在自然界中是普遍存在的。目前,除去真菌、酵母菌、原生动物和低等的藻类植物以外,在各种类型的細菌和放綫菌上,都已經發現有噬菌体。

最初,噬菌体的研究主要是企圖利用溶菌現象來治療病害。最早研究的噬菌体多半都是醫藥微生物的噬菌体,尤其是引起腸胃

道傳染病的微生物。噬菌體在印度曾用于防治霍亂病，并且取得了一些成績。但是总的說來，噬菌體在醫藥上的應用，並沒有特別顯著的成效。植物病理學方面，也有類似的情形。受到醫藥微生物方面研究的影響，植物病理學家也企圖應用噬菌體防治植物的細菌病害，但目前在這方面的成就也不大 (Katznelson, 1937; Stolp, 1956)。

噬菌體研究的進一步發展，就是利用它來研究病害流行學上的問題，如噬菌體與病原菌消長的關係和病原細菌在噬菌體影響下致病性的改變等問題。

1940 年以後，從德爾布洛克 (Delbrück, M.) 等人的工作開始，噬菌體的研究有很大的發展。對於病毒和寄主細胞的關係，病毒的繁殖和變異，化學治療藥劑和抗生素以及其他環境因子對於病毒的影響等一系列問題的研究，噬菌體證明是最適宜的工具。噬菌體的研究對於生命的起源，非細胞有生命物質的形態以及微生物的遺傳和變異等基本問題的探討，也都有很大的意義。

噬菌體對於干酪製造、抗生素生產和其他工業發酵（丁醇丙酮和丁二酮等）上，是很大的障礙。因此，噬菌體的研究也是生產上的重要問題。

放綫菌的噬菌體

放綫菌的自溶 (Autolysis) 是普遍的現象。在瓊膠培養基上，自溶現象的表現就是菌落變為扁平而帶粘性，不產生氣生菌絲，最後菌落溶解而呈透明狀。菌落的溶解並不是全面發生，往往是从中央開始，然後向四周擴展。在液體培養基中，自溶現象多半發生在放綫菌生長的后期。放綫菌的自溶主要是由於生理上的衰老，但有時由於生長受到了抑止或者物理、化學和生物因子的影響，也能引起早期的自溶。除去自溶以外，噬菌體也可以引起放綫菌病態的溶菌現象。

傑米特里也夫 (Дмитриев, 1934; Дмитриев и Фирюкова, 1935; Dmitrieff et Soutéeff, 1936) 最早在放綫菌中報告溶菌現象。牛型放綫菌 (*Actinomyces bovis*) 在培養液中, 培養 2、3 星期以後, 發生溶菌現象。在瓊膠培養基上, 溶菌以後可以形成兩種不同的菌落。第一種和原來的菌落相似, 以後又可以發生溶菌現象。另一種菌落的形狀和原來的不同, 它形成大量的氣生菌絲, 蛋白質酶的活動也較弱。分離以後, 這種菌株就不再發生溶菌現象。

維令嘉和維保爾 (Wieringa and Wiebols, 1936) 從馬鈴薯塊莖上分離到許多放綫菌, 培養後也發生溶菌現象, 以在馬鈴薯瘡癰病菌 (*Actinomyces scabies*) 上最明顯。他們認為這種現象是由傳染性的噬菌體引起, 並且證明這種噬菌體是多價的。從 *Actinomyces bovis* 上產生的噬菌體, 也可以侵染 *Actinomyces scabies*, *Actinomyces farcinicus* 和 *Actinomyces roseus*。他們建議利用這種噬菌體來防治馬鈴薯的瘡癰病。

克拉西尼科夫 (Красильников, 1936) 從土壤中分離到許多放綫菌, 研究它們的自溶現象。在瓊膠培養基平面上, 自溶現象往往從菌落的中央開始, 然後向四周擴展。菌落呈扁平狀而帶粘性, 最後變為透明。這種菌落移殖在新鮮的培養基上往往不能生長或者生長很慢。克拉西尼科夫和科烈雅柯 (Красильников и Коренько, 1939) 認為放綫菌的自溶和特窩最早在細菌中發現的溶菌現象, 和德勒所報告的細菌噬菌體的作用都有些相類似。他們發現這種溶菌物質的作用是專化的。一種放綫菌所產生的“溶菌物質”只能溶解屬於同一種放綫菌的各個菌株。這一點和維令嘉和維保爾的觀察不同。這種“溶菌物質”可耐高溫。在 80°C 處理一小時, 並不喪失作用; 但是在 100°C 處理 5 分鐘就完全破壞。根據克拉西尼科夫的試驗, 這種“溶菌物質”非但可以溶解活的細胞, 對死的細胞同樣也有作用。從這一點可以看出, 這種“溶菌物質”的性質和噬菌體是不同的。

嘉茲納爾遜(Katznelson, 1940)从堆肥中分离到一种好高温的放线菌,在培养基上培养时的温度达到 50°C,很快就發生自溶现象,但是并不能發現傳染性的“溶菌物質”。

鏈霉菌(*Streptomyces griseus*)的自溶现象亦曾受到注意(Schatz and Waksman, 1945)。鏈霉菌在液体培养基中,很容易發生自溶。在沉沒培养的条件下,鏈霉素的產生和菌絲体的自溶有关。菌絲体在开始自溶的时候,鏈霉素的產量最高。自溶發生过早,形成的鏈霉素就受到破坏。

以上这些观察,虽然指出在放线菌中可以类似噬菌体的溶菌现象,但是这种作用的性質还不完全了解,有些溶菌现象可能是由于酶的作用而与噬菌体無關。

1947年,先后發表了四个有关鏈霉菌噬菌体的报告。苏台克和科令斯窩克(Saudek and Collingswork, 1947)最先报告在鏈霉素生產的醱酵罐中,發現一种可以溶解鏈霉菌細胞的物質,这种物質可以穿过細菌濾器,并且能够繁殖。样本中噬菌体的量,可以根据瓊膠培养基平面上溶菌斑的数目測定。电子顯微鏡的观察,証明它的形态和細菌的噬菌体相同。伍德路夫等(Woodruff et al., 1947)也發現同样的現象。振盪培养的鏈霉菌菌种,靜置在試驗室內,表面就形成菌膜。若將菌种的棉花塞除去,在實驗室中曝露 24 小时,新形成的菌膜上發現噬菌体所形成的溶菌斑。在离开實驗室 500 英里以外的醱酵工厂中,也同时發現了鏈霉菌噬菌体。史密斯等(Smith et al., 1947)在保存的鏈霉菌菌种內和醱酵罐中,發現了鏈霉菌的噬菌体。在威克斯曼的實驗室中,也同时進行了鏈霉菌噬菌体的研究。在他們的报告中(Reilly, Harris and Waksman, 1947),对于鏈霉菌噬菌体的作用和性質的各个方面,有了比較詳尽的研究。此后,鏈霉菌的噬菌体也在美國其他各地(Koerber et al., 1950; Carvajal, 1953; Van Alstyne, 1955)和世界各國發現(Розинская и Любимов, 1949; Раутен-

штейн, 1954; Ирезаша et al., 1950; Abe et al., 1952; Welsch, 1954; Welsch et Minon, 1955; Perlman, 1956; 童村等, 1956)。

通过鏈霉菌噬菌体的研究,毫無疑义地証明放綫菌可以受到噬菌体的侵染。在馬鈴薯瘡痂病菌 (*Streptomyces scabies*) 上,已經分离到噬菌体 (Newbould and Garrard, 1954); 土壤中的腐生性放綫菌,也先后發現有噬菌体,这种噬菌体并且多半是多价的 (Gilmour, 1952; Welsch et Minon, 1955)。鏈霉菌噬菌体的寄生范围也不僅限于鏈霉菌,許多在分类上不相近的放綫菌亦受到感染。因此,放綫菌的噬菌体在自然界中可能是很普遍的。

第二章 噬菌体的形态和結構

噬菌体的形态

电子顯微鏡对于病毒形态的研究起着很大的作用。动植物的病毒和細菌的噬菌体，經過电子顯微鏡的觀察，發現都呈現一定的形狀。烟草的花叶病毒是短棒形，番茄矮縮病的病毒近乎圓球形。动物的病毒大部分是方塊形(天花病毒)或圓球形(小兒麻痺病毒)，或者呈現其他形狀。絕大多數已經發現的細菌噬菌体，都是蝌蚪形。头部是橢圓形或接近圓形，头的大小和尾的長短粗細是不一致的。头的大小大致是 $45-50 \times 45-140$ 毫微米，尾粗在 $10-40$ 毫微米之間，尾長約 $100-200$ 毫微米。少数的細菌噬菌体(*Streptococcus lactis*)，尾長達 $500-600$ 毫微米，尾部是直綫形或者稍微弯曲。有些細菌(*Mycobacterium phlei*)的噬菌体，头部是棒形；也有些細菌的噬菌体，是圓形或棒形而沒有尾部。

細菌噬菌体的形态，在病毒中間并不是非常特殊的。圓形或棍棒形而沒有尾部的噬菌体，和动植物病毒的形态相似；动物的病毒(如新城病毒)有时也可以表現为有头和尾的蝌蚪狀，与噬菌体的形狀相似。

各种类型微生物的噬菌体，形态很一致。大腸桿菌(*Escherichia coli*)、乳鏈球菌(*Streptococcus lactis*)和許多放綫菌的噬菌体，形态上是大致相似的。但是在同一种細菌上，也可以分离到形态不同的噬菌体。大腸桿菌的菌株 B 上，分离到七种(T_1-T_7)不同的噬菌体， T_1 、 T_2 、 T_4 、 T_5 、 T_6 的大小虽然不同，但都是典型的蝌蚪狀，而 T_3 和 T_7 則尾部極短而呈方塊狀。

自从鏈霉菌噬菌体發現以后, 接着就有人利用电子顯微鏡來觀察鏈霉菌和其他放綫菌噬菌体的形态。在放綫菌的噬菌体中, 除去一种曾發現是圓球形外(Раутенштейн, 1955), 鏈霉菌的噬菌体和元放綫菌 (*Proactinomyces*) 的噬菌体都是蝌蚪形(圖1)。

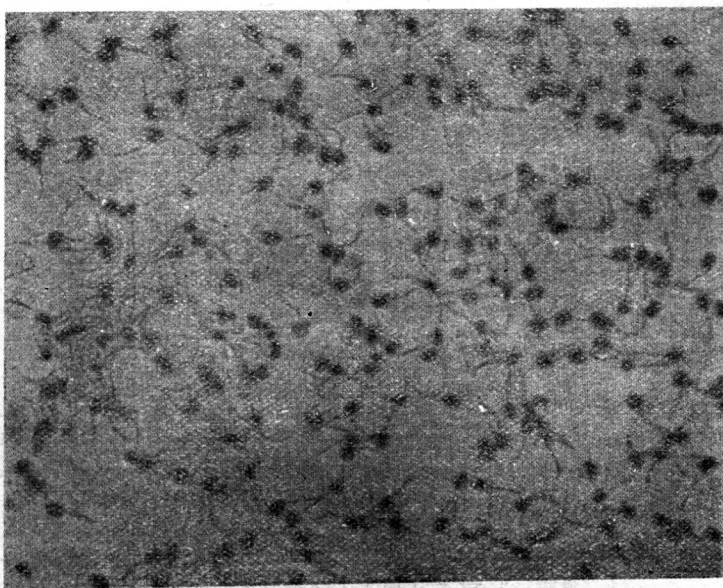


圖1 鏈霉菌噬菌体的形狀 $\times 30000$

(根据 Раутенштейн, 1953)

鏈霉菌噬菌体的形狀和大小, 和細菌的噬菌体相似。各个研究工作者的观察結果如表1。值得指出: 安部等(Abe et al., 1952)所發現的鏈霉菌噬菌体, 顯然要大得多。柯柏等(Koerber et al., 1950)發現兩种类型鏈霉菌噬菌体的形狀虽然都是蝌蚪形, 但是大小不同。II-型噬菌体要比I-型大。大的噬菌体在培养皿上形成的溶菌斑小; 小噬菌体產生的溶菌斑反而大。細菌的噬菌体中, 也有相同的現象。有人認為噬菌体的大小和它擴散的快慢有关, 因

表1 电子顯微鏡觀察下鏈霉菌噬菌體的形狀和大小

觀 察 者	噬菌體 編 號	形 態	大 小	
			頭	尾
苏台克等 (Sandek and Collingsworth, 1947)		蝌蚪形		
伍德路夫等 (Woodruff, Nunheimer and Lee, 1947)		蝌蚪形	0.05 微米	長 0.15 微米 寬 0.015 微米
柯柏等 (Korber, Grenspan and Langlykke, 1950)	I-型 II-型	蝌蚪形	II-型的頭部 較 I-型大	II-型的尾部 較 I-型長
安部等 (Abe, Shiotsu and Endo, 1952)	N-1	蝌蚪形	.12—.13 × .07—.08 微米	長 0.16—0.20 微米 寬 0.03 微米
拉烏欽希金等 (Раутенштейн и др. 1953)		蝌蚪形	卵圓形 長 0.08—0.085 微米	是頭長的兩倍
亞歷山大等 (Alexander and McCoy, 1956)	W-1A	蝌蚪形	0.085 × 0.075 微米	.150 × 0.015 微米
	W-2a	蝌蚪形	0.085 × 0.080 微米	.150 × 0.015 微米
	B	蝌蚪形	0.085 × 0.080 微米	.150 × 0.015 微米
	C-131	蝌蚪形	0.080 × 0.065 微米	.145 × 0.015 微米
	W-1	蝌蚪形	0.10 × 0.10 微米	.250 × 0.025 微米
	W-5	蝌蚪形	0.070 × 0.055 微米	.120 × 0.010 微米
	W-3	蝌蚪形	0.110 × 0.085 微米	.165 × 0.015 微米

而也就影响了溶菌斑的大小。

鏈霉菌噬菌體的頭部一般是卵圓形或接近于圓形。柯柏等發現 II-型鏈霉菌噬菌體頭部的前端比較扁平。伍德路夫等 (1947) 在同一个样本中, 發現形狀特殊的噬菌體。有些噬菌體的頭部是兩個或四個相并而連在一起, 還能發現少數有雙尾的噬菌體。這種畸形可能是變態, 或者是在準備觀察样本時所造成的的人為變化。电子顯微鏡的觀察, 也指出鏈霉菌噬菌體頭部的結構并不均勻的。

拉烏欽希金等 (Раутенштейн и др., 1953) 發現頭部的兩端比較暗而中央則比較光亮, 表示內部結構的差異。

噬菌體頭尾的結構和作用還不完全了解, 鏈霉菌噬菌體有關这方面的資料更少。噬菌體的結構, 在大腸桿菌噬菌體的研究中, 得到較多的資料。噬菌體的成分主要是核酸和蛋白質。細菌的噬菌體, 從高濃度的食鹽溶液 (5 N), 突然移置在低濃度的食鹽溶液 (1 N) 中, 可以使噬菌體的核酸和蛋白質部分分離而形成空頭的“畸形噬菌體” (Ghost)。經過分析, 証明噬菌體所含有的硫 (S) 都在尾部和外膜, 而所含的磷 (P) 則在頭部。因此, 噬菌體的尾部和頭部的膜主要是蛋白質, 而頭部的內含物則是核酸。噬菌體中的脫氧核糖核酸, 受到蛋白質外層的保护, 不受脫氧核糖核酸酶的分解。將核酸從噬菌體中分離出來以後, 就被這種酶分解。噬菌體是以尾部吸附在敏感性細菌的表面, 進入細胞內部而形成新噬菌體的乃是噬菌體的核酸部分。尾部的性質決定噬菌體的特異性, 畸形的噬菌體 (除去了核酸的噬菌體) 仍能吸附在細菌上而使細胞溶解, 但是在溶解以後并不能產生新的噬菌體。以上這種解釋是否正確的反映噬菌體的結構, 目前还不能完全肯定, 并且也不能用來說明沒有尾部噬菌體的構造 (研究証明: 某些以往認為沒有尾部的噬菌體, 事實上有很短的尾部。也有人推測, 沒有尾部的噬菌體, 可能是在制备電子顯微鏡觀察樣本時, 尾部與頭部脫離的原因)。有人提出噬菌體的尾部是它的運動器官, 也有人設想噬菌體的尾部吸附在細菌的表面上, 而噬菌體頭部的內含物 (主要是核酸) 則通過尾部而進入細胞內。這些解釋都還缺少足夠的事實証明。

關於噬菌體的結構, 克里斯和契霍寧柯 (Крисс и Тихоненко, 1953) 提出了新的看法。他們用電子顯微鏡觀察 *Bacillus mycoides* 和 *Bacterium lactis aerogenes* 的噬菌體, 發現也都是蝌蚪形, 但是經過高壓 (5,000 個大氣壓) 處理以後, 發生顯著的改變而

成為綫狀。這種綫狀體的長短不一，長的有4.4—4.8微米。這種綫狀結構是由無數圓形顆粒組成的鏈狀體。克里斯認為這種圓形顆粒是大的蛋白質分子。噬菌體在高压下處理的時間過久(168小時)，或者用濃度很高的尿素溶液(36%)處理，綫狀體就破壞而成分散的圓形顆粒。根據以上的現象，克里斯認為蝌蚪形的噬菌體是由綫狀體卷曲而成，卷曲的部分組成頭部，未卷曲的末端是尾部。捷克的工作者蓋爾契克在1953年也發現同樣的綫狀體。大腸桿菌噬菌體的尾部，是由6—8個圓形的顆粒構成的(Раутенштейн, 1955)。克里斯認為噬菌體的內部結構並不是很複雜的，它是由圓形顆粒組成的念珠狀結構。這一點與前人的觀點不同。無論是電子顯微鏡的觀察、紫外光和其他射線照射的研究、化學分析和血清反應的試驗，都證明噬菌體的結構並不是很簡單的。

克里斯的工作在科學上雖然很有意義，但是這工作的說服力是不夠的。克里斯得到的綫狀體，並不能引起細胞的溶解，也沒有繁殖的能力，因此已經完全喪失了噬菌體的生物學特點。我們知道在很高的壓力處理下，甚至於細胞也可以破碎而形成在形態和大小上比較一致的顆粒。克里斯的工作還不能證明噬菌體的結構是複雜的或者是簡單的。

噬菌體的化學成分

許多種噬菌體已經純化。噬菌體的純化和病毒大致相同，一般採用離心沉落的方法，但是化學沉淀也可以。關於噬菌體的化學成分，以大腸桿菌的噬菌體研究得最多。噬菌體的主要成分是蛋白質和核酸。噬菌體中核酸的含量在40%以上，比動植物病毒的核酸含量都高。噬菌體中的核酸都是脫氧核糖核酸(DNA)；動物的病毒，除去脫氧核糖核酸以外，還可發現核糖核酸(RNA)，而植物病毒的核酸則都是核糖核酸。噬菌體中脫氧核糖核酸的含量，要比寄主細胞高得多，而寄主的細胞中還含有核糖核酸，所以

噬菌体的成分和寄主細胞的成分是顯然不同的。噬菌体中是否含有核糖核酸和脂肪类物質，存在着不同的意見。曾有人在噬菌体中發現有少量的核糖核酸和脂肪类物質，但以后証明这是由于噬菌体純化不完全而間雜了一些寄主細胞中的物質。一般脫氧核糖核酸中的嘮啶基是胞核嘮啶 (Cytosine)，但是在某些噬菌体 (T_2 、 T_4 、 T_6) 中，含有一种特殊的嘮啶基：羥甲基胞核嘮啶 (hydroxy-methyl-cytosine)。这种特殊的嘮啶基，無論在寄主細胞和其他來源中，都未曾分离到过，說明噬菌体的形成有它特殊的合成过程。

純化的噬菌体，可以用微生物的生物測定或紙上層析的方法，分析蛋白質中的氨基酸。大腸桿菌的噬菌体 (T_2 、 T_4)，可以含有19种氨基酸。含量比較高的氨基酸是天門冬氨酸 (Aspartic acid)、谷氨酸 (Glutamic acid)、丙氨酸 (Alanine)、甘氨酸 (Glycine)、苏氨酸 (Threonine)、精氨酸 (Arginine)、亮氨酸 (Leucine) 和異亮氨酸 (Isoleucine) 等。值得指出的就是色氨酸 (Tryptophane) 对于某些噬菌体的繁殖是必要的輔因子 (co-factor)，但是噬菌体中色氨酸的含量并不高。

关于鏈霉菌的噬菌体，还没有進行化学分析的工作。

噬菌体的抗原性

噬菌体具有抗原的性能。噬菌体注射到动物 (家兔最常用) 体内，在血液中產生抗体而得到抗噬菌体的血清。为了獲得抗噬菌体的血清，簡便的方法就是將細菌培养在組合培养液或其他天然培养液中，加入噬菌体，俟細菌溶解以后，培养液用細菌濾器過濾，即可作为注射用的抗原。注射用溶液中噬菌体的含量愈高愈好，每毫升中噬菌体的含量不宜小于 1×10^{10} 个。注射的方法和一般病毒相同。第一次注射的量較小 (0.5毫升)，以后每隔 4—5 天重复注射一次，逐漸增加注射的量。前后大致注射 5—6 次，最后一次注射的量約 2 毫升。在末一次注射后一星期左右，測定血液中抗体