

兰州生物制品研究所
科学技术年刊 (1979)

兰州生物制品研究所1979年科学技术年刊

目 录

努力攀登生物制品科学技术高峰.....	齐长庆 (1)
痢疾杆菌血清抗原结构与其免疫力关系的探讨	王秉瑞 江丽君 (4)
炭疽抗毒素的研究	
一、炭疽毒素的制备和检定	何长民、张声、黄庆声、张保安、董树林 (9)
二、炭疽毒素的免疫学活性	何长民、张声、董树林、张保安 (18)
痢疾弱毒株的选育	
一、用杂交法选育弱毒菌株的探索	宋树珍、陈琦媛、王秉瑞 (24)
二、痢疾杂交株的生物学及免疫学特性的观察	江丽君、杨佑琴、王秉瑞 (25)
三、痢疾杂交株HF3a ₄₋₁₇ 株猴体免疫力试验	痢疾组 (26)
痢疾福氏Ⅲ型依链株选育工作的初步报告	检定科、菌苗室 (27)
福氏志贺氏2 _a 依链株与T ₃₂ 株的比较	江丽君、杨佑琴、王秉瑞 (28)
土拉活菌苗的研制	炭疽组 (32)
有关鼠疫F ₁ 抗原血球敏感性及特异性的试验观察	李佩霞、 李佩霞 (33)

土拉杆菌的无血培养基选择

.....张守让、张保安(40)

一起E型肉毒中毒

.....气性坏疽组(43)

聚乙二醇法提纯纤维蛋白原

.....血液制剂室(48)

抗免疫球蛋白血清的制备和应用

.....检定科(53)

国产“曙光”醋纤膜用于检定蛋白质纯度的电泳试验小结

.....生化组(59)

人胎盘血白蛋白聚合体的分离和分析

.....生化组(65)

凝胶层析及SDS—盘电泳法测定蛋白质分子量的应用实验

.....程夷、郑华春、张雨谦(69)

冻干甲胎蛋白诊断血球的试制及临床应用

.....蔡玲氏(77)

霍乱滤液的液体培养小结

.....周学良、段阳抒、王阿秀(80)

吸附精制破伤风类毒素的试制研究

.....王成怀、张 瀚、许新华、段珊瑚(83)

新疆出血热灭活疫苗的研究

一、疫苗的制备和检定初步小结

.....孙柱臣、邱珍生、黄金保、杨科科、张国富(90)

二、疫苗接种人体后的反应观察及抗体水平测定

.....出血热研究组(98)

甲₁型流感病毒减毒株的选育及人体接种观察

卫生部生物制品研究所流感组、兰州生物制品研究所
流感组、北京军区军事医学科学研究所流行病科 (106)

甲₁型流感病毒减毒株(抑制素抵抗株)的选育及人体 接种观察

.....白植生、蒋兆英、吴妙玲、吴玉梅 (110)

麻疹活疫苗生产中几个问题的探讨

.....殷绥亚整理 (115)

冻干麻疹活疫苗试制工作总结

河南信阳地区卫生防疫站 新县陈店公社卫生院
信阳县佯河公社卫生院 兰州生物制品研究所
冻干组、麻疹组 (125)

麻疹活疫苗在秋季无冷藏条件下运往农村使用的效果 观察

.....麻疹组 (132)

破伤风马匹免疫的研究

一、破伤风马匹自然抗体含量与基础免疫效价的关系

.....王永尧、范志、张发臣 (135)

二、基础免疫与超免疫方法的探讨

.....王永尧、范志、张发臣 (137)

三、关于血清免疫效价测定方法的比较试验

.....王永尧、范志、张发臣 (143)

精破类油剂免疫和原破类常规免疫马血清的蛋白组成 和抗体分布

程夷、周于灿、周书全、周吉定、徐尚爱、王永尧 (145)

1949—1979(1—6)科学技术资料索引 (151)

努力攀登生物制品科学技术高峰

齐 长 庆

新中国成立三十年了，随着社会主义革命和建设的伟大胜利，我国生物制品事业也有了很大发展。许多曾严重危害我国人民健康的烈性传染病，有的已经基本消灭，有的得到控制。大量的、新的生物制品的研制成功，为保障人民健康提供了必要的条件。这些年来，由于林彪、“四人帮”的干扰破坏，生物制品事业发展缓慢，甚至停滞不前，与国际先进水平的差距拉大了。当前，以华主席为首的党中央正领导全国人民意气风发地进行新的长征，生物制品战线也生气勃勃。对此，作为一个从事生物制品事业六十年的老科技人员，我由衷地感到高兴和自豪。追抚往事，展望未来，感慨交集，思绪万千。借此，愿谈一些个人管见，以此抛砖引玉。

首先，我想说中国人民、中国科技人员有智慧、有能力，一定能够赶上世界先进水平。

生物制品问世至今不到二百年历史，我国开始发展不过六十多年。然而，生物制品并非都是西方发明的。人工免疫最早就是我们中国人创造的。这在北宋真宗（公元988年——1022年）时，就有“峨眉山人为丞相王旦之子种痘”的记载。到了明代隆庆年间（1567年——1572年），制成了“太平疫苗”，以预防天花。这些，要比英国人琴纳氏的牛痘苗（1798年）分别将近八百年和二百多年。无论是在免疫学理论，还是在免疫学实践方面，中国都曾处于世界领先的地位。只是由于反动统治阶级对自然科学的压制，才使我国科学技术在近代落后于西方国家。

即使在这种情况下，中国科学技术人员也不乏埋头苦干，以自己的学识振兴科学，为民族争光之人。就拿生物制品来说，一九一七年，内蒙萨拉族发生鼠疫流行，随即在北京天坛筹办防疫处，开始试制防疫制品，一九一九年正式设立旧中央防疫处，有了中国的生物制品研究机构。但是规模很小，产品单一，杯水车薪，供不应求。加之当时军阀混战，民不聊生，所产制品，广大劳动人民根本得不到使用。那时，器械、药品及部分原材料均靠进口，甚至玻璃器皿也依赖外国。不得已，被迫自己附设工厂生产中性玻璃器具。就这样，为解决当时几种烈性传染病，开始了生物制品的研制工作。

一九二一年，我国开始血清制剂的免疫马匹研究工作。在极端困难的条件下，筹集了二匹马进行破伤风免疫。当时国外采用毒素加抗毒素作为基础免疫，在免疫过程中动物一旦发病，即用抗毒素治疗。但那时我国没有抗毒素制剂，只好冒着失败的风险开展工作。结果两匹马在免疫过程中都因破伤风发病，一匹死亡，一匹危在旦夕。我们采用

临床治疗措施，日夜护理，积极抢救，终于使仅存的这四匹马恢复了健康。经采血检定证明破伤风抗毒素免疫成功了。从此，我国有了自己生产的破伤风抗毒素，我国破伤风抗毒素生产的基础由是奠定。

为解决天花和其他疾病流行问题，我们开始致力于选育我国地方性优良毒株的工作。一九二六年，终于选育出我国牛痘苗生产用地方毒株，命名为“天坛株”。次年，成功地固定了狂犬疫苗生产用地方毒株，命名为“北京株”。经过生产和应用，证明这两个毒株，均有免疫原性高，稳定性好的优点，至今为我国生产牛痘苗和狂犬疫苗所沿用。

这都是几十年前的往事了。那时我和多数同仁们大都抱着科学救国的思想，不同程度地做了一些事情，使我国生物制品事业从无到有。然而，与愿望比较，毕竟所得甚少。平心论之，并非我国科技人员没有本领，而是反动统治太黑暗，生物制品事业得不到支持的缘故。这个道理，解放以后已得到了充分的证明。所以，我要说的第二点就是：

共产党的领导、社会主义制度是生物制品事业赶超世界先进水平的根本保证。

我搞生物制品六十年了，亲身感受到旧社会从事科学事业的艰辛痛楚，也亲眼看到解放三十年来生物制品事业的飞速发展。就拿我所来说，前身是国民党设立的西北防疫处。占地仅是三十亩，人员不过三十余；设备仪器陈旧简陋，技术人员寥若晨星。以此区区，想满足广大的西北防疫之需，实难胜任。而反动统治阶级对科学的重视程度，亦可见一斑了。

解放后，党和政府关心人民卫生事业，决定扩建兰州所。经过几年努力，克服各种困难，兰州所现在占地达六百多亩，建筑面积四万六千多平方米。为满足生产和科研的需要，国家调配了高、中级科技人员，职工队伍也不断扩大，比解放初增加二十多倍。仪器设备基本齐备，制品种类逐年共增加近十倍，基本满足了西北五省（区）近一亿人份预防、治疗和诊断各种传染病的需要，质量也大为提高，部分制品供应全国，少数制品支援国外。

与此同时，在科研方面也取得了不少成绩。在新制品方面，研制成功了肉毒及炭疽的预防、治疗、诊断用配套制品；人胎盘水解液以及正在试制中的Q热疫苗，口服痢疾活菌苗，新疆出血热疫苗，各种免疫诊断制剂等。

所有这些成就，都充分说明了党的领导、社会主义制度是生物制品事业飞速发展的根本保证。有了这个保证，我国科技人员才能最大限度地发挥自己的才干，取得越来越多的成绩。也才能使我国生物制品事业由小到大，成为具有一定规模、拥有相当力量的一个部门。所有这一切，就构成了我们的基础。站在这个基础上，我们对赶超世界先进水平是应该有信心的。但是，光有信心是不够的，还必须：瞄准与世界先进水平的差距，脚踏实地地狠抓薄弱环节，以图迎头赶上。这就是我想说的第三点。

古人有言：“九层之台，起于累土；合抱之木，发于微末；千里之行，始于足下”。生物制品事业要赶超世界水平，必须切切实实干上几件事，特别要抓好当务之急。我以为发展生物制品事业，必先培养技术人才，不断壮大技术队伍。建国三十年来，造就了一批科技人员，形成了一支队伍。但由于林彪、“四人帮”的浩劫，这些人员有的

年事已高，有的学业荒疏，尤其以青黄不接为明显。所以培养人才乃为燃眉之急。其办法一是建议国家在某些医学院增设生物制品系，或代为培养研究生，二是各所都可办培训班，将具有初、高中文化程度的青年职工逐步培训成具有相当专业水平的人才；同时，各所一些有一定理论水平和科学实践的同志亦可带研究生。人才出自青年，愿大家共勉，勤奋学习。学识无涯，如山似海，只要刻苦用功，坚持不懈，久而久之，必有成就。要热爱科学、热爱专业、热爱本职工作，艰苦奋斗，数十年如一日，忠诚老实，积极负责，做一颗永不生锈的螺丝钉。不但要学科学知识，还要学好操作技术，基本功要熟练。即使是洗刷、饲养动物，亦事关重大，不可忽视。切勿这山望着那山高，好高骛远。个人所见，切望青年同志深思。

要加强基础理论的研究。

生物制品涉及学科较多，但基础系微生物学，近年来分子生物学、免疫学、遗传学的飞速发展，给生物制品注入新的活力，其他如生物化学、医学流行病学亦为生物制品所必需，切不可偏废。基础理论扎实者，眼界就开阔，犹如根深才能叶茂。最近，痢疾研究组的同志用遗传方法，把大肠杆菌与痢疾杆菌杂交，获得痢疾杂交株，即为一个很好的例子。在基本理论上一旦有所突破，一定会给生产和技术带来重大进步，所以，一定要在这方面狠下功夫。

要选育我国地方性优良菌（毒）种。尽量采用新技术新方法，改进生产工艺。

近年来在选种、抗原提取、免疫学试验等方面，出现了诸如微量分析、放射标记、酶制品及酶技术等用于检定的较为可用的技术方法。这些方法较为科学，值得采用。在采用新技术的同时，要大力改革生产工艺，尽量采用机械化、自动化的生产方法，改变落后的手工生产方式，提高质量，增加产量，使技术人员集中精力投入到科研工作中去。

其它如建立实验室动物繁殖、饲养供应中心等工作，也应迎头赶上。

所举这些，说来容易，实施艰巨。但只要下定决心，切实抓上一、两件，积少成多，必能赶超世界先进水平。

以上所见，仅供同志们参考。

目前，全国都在贯彻中央“调整、改革、整顿、提高”的八字方针，为全面跃进打好基础，积蓄力量，而前景之辉煌，更是确定无疑了。然而任重道远，有待全国人民共同奋斗。我虽然已八十二岁了，但愿老骥伏枥，壮心不已，一心要紧跟华主席为首的党中央，进行新的长征，为生物制品事业的现代化贡献自己的力量。

回顾往事，感慨万千；喜看今日，展望未来，生意盎然。同志们，努力！

痢疾杆菌血清抗原结构与其 免疫力关系的探讨

王秉瑞 江丽君

摘 要

用痢疾福氏志贺氏 γ 变种、无群抗原的福氏志贺氏4a株及经痢疾杆菌与大肠杆菌K12株杂交所得HF₂₄₀₄（抗原式为M₁：—）、HF2a-1（抗原式为—：3,4）等菌株进行小鼠和豚鼠交叉免疫力试验，观察血清抗原结构与免疫力的关系，结果仅具群抗原之杂交株HF2a1即 γ 变种能保护相应毒菌及福氏志贺氏2a毒菌的感染，但不能保护福氏志贺氏3a型毒菌的攻击。说明血清型抗原与免疫力的关系并不完全相关，而似与同源菌株有关。

近年国内外对菌痢的免疫问题进行了广泛研究。通过临床及实验观察证明，菌痢具有获得性免疫，但免疫强度弱、持续时间短、具有型特异性倾向。斋藤①对痢疾患者进行观察后曾指出，同一菌型引起的再感染病例一般症状较轻，且多在一年以后发生，而由不同菌型引起的再感染则比同型者为多。Mel②通过对F2a株痢疾活菌苗的人群效果观察表明，它对同型菌感染具较好免疫力，但对异型菌感染没有保护作用。这似乎说明菌痢的特异免疫与痢疾杆菌的血清抗原结构有关。但是Levine③的工作却恰恰相反，他们以大肠杆菌为受体，将福氏志贺氏2a菌的型抗原和群抗原转移过去，用之免疫人体不能保护同型菌的感染。因此福氏志贺氏菌的型及群抗原与其免疫的关系如何，值得研究，对痢疾菌苗的研制工作有着重要的意义。

为此，我们以自然变异以及痢疾杆菌与大肠杆菌杂交获得的只含单一型或群抗原的菌株，在实验室进行了动物免疫力试验观察，对上述问题进行了初步探索。现将实验结果报告如下。

材 料 与 方 法

1、试验菌株来源、抗原特征及用途（见表1）

表 1、试验菌株来源、抗原式及用途

菌株号	来 源	抗 原 式	用 途
2001, F4a	诊断血清生产用	IV : —	免疫, 再感染
HF ₆ 2404	杂交株a	VI : —	免疫, 再感染
HF ₂ a-1	杂交株b	— : 3.4	免疫, 感染
2103, y变种	诊断血清生产用	— : 3.4	免疫, 感染
F2a-9	痢疾毒株	I : 3.4	感染
F3a-75	痢疾毒株	II : 6.7	感染
F4	痢疾毒株	IV : 3.4	感染
F6	痢疾毒株	VI : 3.4	感染

注: a、为本实验室以大肠杆菌HfrC和痢疾杆菌F₆2404(F6型)杂交获得的失去群3、4抗原的杂交株, F₆2404株为受体菌株。

b、同a项, 为受体F2a-1(F2a型)失去型I抗原的杂交株。

2、培养基: 采用厚金格尔琼脂斜面培养基, 所试验菌株均于37°C培育18—20小时, 以灭菌生理盐水制备菌悬液。

3、小白鼠免疫力试验:

(1) 变量免疫定量攻击: 以2001、HF₆2404、HF₂a-1、2103各株煮沸灭活之0.5毫升含菌 2.5×10^8 、 5.0×10^8 、 10.0×10^8 之菌液, 每次皮下注射体重为14—16克健康小白鼠, 每组十只, 每菌株三个剂量组, 间隔三天, 免疫三次, 总剂量是 $3 \times (2.5 \times 10^8)$ 、 $3 \times (5.0 \times 10^8)$ 、 $3 \times (10.0 \times 10^8)$ 。于末次免疫后10天, 以相应菌株(见表2), 按4个LD₅₀剂量腹腔注射5%胃膜素菌悬液0.5毫升, 观察3天, 测定保护率。毒力均经预先测定。下同。

(2) 定量免疫变量攻击: 所用免疫菌株同(1), 免疫剂量均为每0.5毫升含菌 10×10^8 , 免疫途径、次数、间隔及动物体重与(1)同, 于末次免疫后10天, 分别以相应毒株(见表3)之4与8个LD₅₀剂量感染, 每只小鼠腹腔注射5%胃膜素菌悬液0.5毫升, 观察3天, 测定保护率。

4、豚鼠角膜免疫力试验:

采用活菌免疫, 因所用菌株皆具有毒力, 故感染康复后行再感染, 即类似病后免疫。

轻度感染: 选体重300—400克健康豚鼠, 以2001、HF₆2404、HF₂a-1、2103株含2个最小感染量(分别为 1×10^8 、 2×10^8 、 1.5×10^8 、 0.5×10^8)之菌液0.1毫升滴入豚鼠角结膜内, 每菌株接种豚鼠10—14只。持续观察豚鼠接种后角结膜炎性反应及逐渐康复之状况。

再感染: 于豚鼠角膜轻度感染后1—2个月, 感染眼康复后, 分别以感染菌株0.8个最小感染量再次感染试验组豚鼠康复眼及对照组豚鼠角结膜, 观察7天, 记录豚鼠角结膜反应。

5、免疫血清制备：为了检查HF2a-1株是否尚有福氏Ⅱ型抗原，以之制成菌液，按常规免疫体重200克家兔2只，经试血后无菌采血分离血清，用玻片及试管沉集试验进行检查。

试 验 结 果

1、小白鼠免疫力试验结果见表2、3。单纯具有型抗原的2001与II₂2404株除能保护对应型毒株攻击外，也能保护单纯具群3、4抗原毒菌的攻击，不但较高剂量（每次10亿）免疫者如此，低剂量（每次2、5亿）免疫也具有同样效果；单纯具有群3、4抗原的菌株，不论是通过杂交丢失了型抗原的HF2a1株，还是y变种2103株均能使免疫小鼠既能耐受单纯具群抗原3、4的毒株的攻击，也能耐受具型抗原的F2a-9毒株的攻击，但对异型菌F3a-75毒株的攻击却不能保护。从表3可以看出，用10亿死菌免疫之小白鼠可以耐受4个LD₅₀剂量相应菌株的感染，若加大感染剂量如8个LD₅₀剂量，保护率有所降低。以上结果表明免疫力与血清抗原结构之间似无明显的关系，而与同源菌株有关，如HF2a-1能保护F2a-9株的感染，可能它们之间存在着其他的共同免疫原成份，而异型菌株则无该种成份。y变种之能保护福氏2a毒株，似可推测其系自福氏2a菌变异而来。唯此点尚须其他含群3、4抗原的菌株的验证与补充试验。

在变量免疫定量攻击中，其对照组F3a-75、F4、F6、HF2a-1组小白鼠全部死亡，F2a-9及2103对照组小鼠死亡90%，除F3a-75对照组外，余者皆与相应免疫组的死亡率具有显著性差异。

表2、小白鼠变量免疫的免疫力试验结果

免疫菌株	免疫剂量 (1×10^8 /次)	感染菌株	感染剂量	保护率 %	P值
2001	2.5; 5.0; 10.0	F4	1.2×10^5	100; 100; 100	均 < 0.001
	2.5; 5.0; 10.0	HF2a-1	2.5×10^5	80; 90; 90	均 < 0.001
HF ₂ 2401	2.5; 5.0; 10.0	F6	2.8×10^5	100; 100; 100	均 < 0.001
	2.5; 5.0; 10.0	HF2a-1	2.5×10^5	90; 100; 100	均 < 0.001
HF2a-1	2.5; 5.0; 10.0	F2a-9	1.2×10^4	100; 100; 100	均 < 0.001
	2.5; 5.0; 10.0	HF2a-1	2.5×10^5	100; 100; 100	均 < 0.001
	2.5; 5.0; 10.0	F3a-75	1.2×10^3	10; 0; 10	均 > 0.05
2103	2.5; 5.0; 10.0	F2a-9	1.2×10^4	80; 100; 100	均 < 0.001
	2.5; 5.0; 10.0	HF2a-1	2.5×10^5	90; 100; 100	均 < 0.001
	2.5; 5.0; 10.0	2103	5.2×10^4	100; 100; 100	均 < 0.001
	2.5; 5.0; 10.0	F3a-75	1.2×10^3	20; 10; 10	均 > 0.05

表3、小白鼠定量免疫变量攻击的免疫力试验结果

免疫菌株	感染菌株	感 染 剂 量	保护率%	P值
2001	F4	1.2×10^5 ; 2.4×10^5	100; 70	<0.001 ; <0.005
	HF2a-1	2.5×10^5 ; 5.0×10^5	90; 60	<0.001 ; <0.005
HF ₂₄₀₄	F6	2.8×10^5 ; 5.6×10^5	100; 80	<0.001 ; <0.001
	HF2a-1	2.5×10^5 ; 5.0×10^5	100; 70	<0.001 ; <0.005
HF2a-1	F2a-9	1.2×10^4 ; 2.4×10^4	100; 90	<0.001 ; <0.001
	HF2a-1	2.5×10^5 ; 5.0×10^5	100; 100	<0.001 ; <0.001
	F3a-75	1.2×10^3 ; 2.4×10^3	10; 0	>0.05 ; >0.05
	F2a-9	1.2×10^4 ; 2.4×10^4	90; 60	<0.001 ; <0.005
2103	HF2a-1	2.5×10^5 ; 5.0×10^5	90; 70	<0.001 ; <0.005
	2103	5.2×10^4 ; 10.4×10^4	100; 60	<0.001 ; <0.005
	F3a-75	1.2×10^3 ; 2.4×10^3	10; 0	>0.05 ; >0.05

2、豚鼠免疫力试验结果见表4。

经2001及HF₂₄₀₄株轻度感染后之豚鼠角膜于再感染同型毒菌时，免疫组保护率达80%（即发病率为20%）而其相应对照组F4及F6之发病率分别为80%与90%。二者相比具有显著性差异。此外，上述菌株轻度感染之豚鼠康复眼亦能耐受单纯具有群3、4抗原的毒株的再感染，经HF2a-1及2103株轻度感染后之康复角膜于再感染F2a型毒菌及单纯具群抗原3、4的毒株后均具有免疫力，与对照组F2a-9、HF2a-1、2103发病率分别为100%、100%、80%相比，具有显著差异。但却不能耐受异型菌F2a-75株的再感染，F3a-75对照组发病率为70%。

表4、豚鼠角膜免疫力试验结果

	再感染菌株	感染剂量	保护率%	P值
2001	F4	6.4×10^8	80.0(8/10)	<0.001
	HF2a-1	8.0×10^8	66.6(8/12)	<0.005
HF ₂₄₀₄	F6	5.6×10^8	80.0(8/10)	<0.001
	HF2a-1	8.0×10^8	70.0(7/10)	<0.005
HF2a-1	F2a-9	4.0×10^8	70.0(7/10)	<0.005
	HF2a-1	8.0×10^8	71.1(10/14)	<0.001
	2103	6.4×10^3	60.0(6/10)	<0.005
	F3a-75	0.4×10^3	10.0(1/10)	>0.05
2103	F2a-9	4.0×10^8	80.0(8/10)	<0.001
	HF2a-1	8.0×10^8	60.0(6/10)	<0.005
	2103	6.4×10^8	70.0(7/10)	<0.005
	F3a-75	0.4×10^8	20.0(2/10)	>0.05

3、HF2a-1免疫血清凝集试验结果

HF2a-1免疫血清经玻片及试管凝集试验,除与生产用 γ 变种及本菌HF2a-1株凝集(玻片凝集 $24H$ 、试管凝集效价均为 $1:640$)以外,未见与其他型菌相凝集。

讨 论

本试验以单纯具有型或群抗原的灭活痢疾毒菌免疫小白鼠以及采用上述活菌轻度感染豚鼠之角膜进行免疫力试验,结果证明免疫小白鼠与康复豚鼠角膜对同型毒菌以及单纯具群抗原3、4的毒菌的感染均具有抵抗力。从而说明福氏志贺氏菌的型抗原结构在免疫机制中,并非唯一的决定性因素,单纯具有群抗原3、4结构的菌株,也能引起对带有型Ⅰ抗原毒菌感染的抵抗力,由此可以推测,在痢疾杆菌内可能存在着一些尚未认识的另外的具免疫原性的因子。倘若存在,则可以设想,在研制菌痢预防制剂时,将血清抗原型作为权衡其具有免疫力的唯一指标,似乎还有商榷的余地。

最近,美国的Levine等人将福氏志贺氏2a菌做给体,大肠杆菌(RJ₉₁)做受体,二者杂交,使前者的型及群抗原转移至后者,以杂交成功的大肠杆菌制备菌苗免疫人群,未能获得有效的结果。这一报告说明,虽然大肠杆菌获得了福氏志贺氏2a菌的型和群抗原基因,但仍然不能保护人体耐受痢疾毒菌的感染;换言之,型抗原并非免疫力的决定因素。间接说明了以弱毒株免疫人群或强毒菌感染后的获得性免疫可能取决于型抗原结构以外的因子,该种因子究竟是菌体何种成份,据Thorne等⁽⁴⁾推测可能与肠毒素有关。对这一问题,有必要从分子水平进行深入的研究。

参 考 文 献

- (1) 合田朗: 日本传染病学会杂志, 40: 74, 1966
- (2) Mel D.M. et al: Bull WHO 45: 457—464, 1971.
- (3) Levine M.M. et al: J. Inf. Dis 136(4): 577—582, 1977
- (4) Thorne G.M. et al: J. Inf. Dis 136(4): 601—604, 1977

炭疽抗毒素的研究

一. 炭疽毒素的制备和检定

何长民 张声 黄庆声 张保安 董树林

炭疽杆菌是细菌学发展史中发现较早的病原菌之一，然而有关炭疽杆菌产生毒素的实验研究工作，只是近二十年来才取得了一些新的进展。

根据国外资料，人工培养炭疽杆菌时，分离毒素往往不易成功，迄今尚无统一的生产工艺和检定方法。其原因主要在于产毒条件要求严格，毒素活性不高，毒素不稳定，易受工艺过程中诸因素的影响（如除菌过滤易被吸附，操作环境温度过高易被降解）等。我们本着自力更生的精神，因地制宜，就地取材，对菌种、培养基、生产工艺和检定方法等进行了较系统的比较试验。

一、毒素制备

应用人工培养方法制备炭疽毒素，培养基的选择是其关键问题之一，不仅要保证获得优质制品，而且要注意到取材方便，物美价廉，制备简单。其它如细菌接种量的大小和培养时间的长短以及培养温度等均对产毒有重要影响。

（一）产毒培养基的选择：

采用酪氨酸合成培养基。其成份除了五种氨基酸、葡萄糖、维生素、嘌呤、嘧啶以及无机盐类外，主要氮源采用我所制造的酸和胰酶水解的酪蛋白。基础液共分13种，一次配制后可供多次制造培养基用。培养瓶采用毒素瓶，装量230毫升。

产毒用培养基：

1. 100毫升水中含 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 73.6毫克
2. 100毫升水中含 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 98.6毫克
3. 100毫升水中含 $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 8.6毫克
4. 硫酸腺嘌呤：21毫克；腺嘧啶：14毫克。

两种固体溶于10毫升水中，加水至100毫升。

5. 100毫升水中含维生素B15毫克。
6. 色氨酸：520毫克溶于1.2毫升的6N HCl液中；
胱氨酸：120毫克溶于20毫升水中；

甘氨酸：150毫克溶于30毫升水中；

将三种溶液混合，加水至100毫升。

7. 100毫升水中含L——谷氨酸160毫克；L——脯氨酸115毫克。

8. 100毫升水中含 KH_2PO_4 6.8克。

9. 100毫升水中含 K_2HPO_4 8.72克。

10. 100毫升水中含活性炭720毫克。

11. 50毫升水中含葡萄糖10克。

12. 200毫升水中含 NaHCO_3 18克。

13. 2%酸酪：氨基氮2.48毫克/毫升；胰酪：氨基氮4.66毫克/毫升。二者比例为1:1。

培养基配制：

1. 取1~9溶液各10毫升置2000毫升容器中，分别按比例加入2%酸酪和胰酪，混匀，测定PH值至6.9，以230毫升量分装于培养瓶中，然后每瓶中再分别加入活性炭溶液1毫升，15磅30分钟灭菌。

2. 葡萄糖溶液8磅30分钟灭菌，于接种前每瓶中加入2.5毫升。

3. NaHCO_3 溶液用垂熔玻璃G5滤器除菌，于接种培养4小时后每瓶分别加入27.5毫升。

(二) 菌种产毒比较：

炭疽毒素的产生与菌种毒力强弱，分解动物蛋白与否，有无荚膜以及形成芽胞的能力等没有规律性的关系。基本上所有的炭疽菌株，不管它们的毒力如何，均可产生毒素。目前以菌苗菌株较为常用，这是因为其操作安全，没有荚膜谷氨酸多肽的存在滤过迅速的缘故。为了筛选产毒用菌株，我们采用了三株菌苗菌株，A16R株（我国地方菌株），Sterne株（国外菌株），CTH—1株（国外菌株）。其中Sterne和CTH—1株系不分解蛋白菌株，A16R株系分解蛋白菌株。我们对于三株不同菌株的产毒能力，分解与不分解蛋白，菌株对产毒的影响，以及种子培养物采用芽胞或菌体接种的产毒情况，进行了比较试验。

1. 不同菌株产毒比较：

试验结果表明（见表1）：三株菌株（A16R，CTH—1，Sterne）的琼扩试验，其粗制毒素的琼扩单位为5~20单位/毫升；均可出现1~2条沉淀线。其浓制毒素的琼扩单位则可高达40~60单位/毫升；出现2~4条沉淀线。家兔皮肤水肿试验的水肿大小虽然不够规律，但不管是粗制或浓制毒素的水肿单位均可达10~320单位/毫升。乳鼠致死试验，粗制毒素不能致死乳鼠，但浓制后则致死效果明显，一般说其浓制倍数在10倍以上者均可全部致死试验动物。

总观上述结果，说明三株菌株均能产生毒素，分解蛋白与否不是产毒的先决条件。比较而言，以Sterne株产毒较为全面。

2. 芽胞和菌体产毒比较：

产毒用种子培养物，国外资料均采用芽胞悬液，接种菌体是否产毒未见报导。我们

采用芽胞和菌体种子培养物, 分别用三株菌株进行了比较试验(见表 I ~ IV)。

结果表明, Sterne株 CTII—1 株以及 A 16 R 株采用菌体种子培养物进行培养, 均能获得优质毒素。与采用芽胞种子培养物进行培养者相比有其优点, 不仅在三种检定方法的结果上比较全面稳定, 而且在工艺上简便, 缩短制造周期 5 ~ 7 天。

3. 接种不同菌量产毒比较:

菌株选用 (CTII—1 弱毒株, 接种于厚金格尔琼脂斜面上, 置 37 °C, 培养 24 小时后, 制成生理盐水菌体悬液备用。每毫升培养液中分别接种菌体 5,000 个; 50,000 个; 500,000 个; 置 37 °C 培育 4 小时后分别加入 NaHCO₃ 溶液 27.5 毫升, 复置 37 °C 培育至 24 小时后进行收获。经除菌, 浓缩后进行检定。结果见表 II。

结果证明以每毫升培养基接种 500,000 个菌体者, 共产毒较一般国外认为每毫升培养基接种 5,000 个芽胞者为好。

生长情况:

5,000 个菌体/毫升: 生长旺盛, 呈绿豆大絮团状生长, 液体澄清。

50,000 个菌体/毫升: 生长旺盛, 呈绿豆大絮团状和长絮片状生长, 液体澄清。

500,000 个菌体/毫升: 生长旺盛, 呈长絮片状生长, 液体澄清。

(三) 提取毒素的工艺改进:

炭疽毒素的体外获得, 目前还没有一种可靠而标准的产毒工艺。为了探索设备简单, 操作方便, 制造时间短的工艺流程, 我们主要针对影响毒素质量的两种因素作了试验。一种是滤器的问题, 采用国产玻璃垂熔滤球和硅胶玻璃纤维滤板进行对比; 二是除菌过滤时加与不加 10% 健康马血清。

从表 III 的结果可以看出, 不管是滤球或硅板除菌过滤, 均可获得优质毒素。如果以硅板代替以往使用的滤球, 则可省去处理滤球的繁琐手续, 大大缩短工艺过程。

表 IV 的试验结果表明, 采用滤球或硅板进行除菌过滤时, 加与不加 10% 健康马血清, 对毒素质量影响不大。不加马血清还可以保证获得较纯一的毒素制剂。

二、毒素检定方法探索

炭疽毒素的检定方法, 目前还没有统一的标准。有关毒素的生物学和血清学活性以及理化性质, 目前积累的材料不多, 要制定统一标准尚不成熟。关于生物学活性方面, 我们选用了两种方法: 家兔皮肤水肿试验, 皮内注射毒素后, 可引起坏死或水肿, 损害的直径和深度与毒素质量有关, 能以引起皮肤产生损害的毒素最高稀释度作为皮肤反应单位。这种方法(见表 I ~ 表 IV)比较敏感, 但引起皮肤坏死和水肿的大小都不够规律。要确定标准的皮肤反应量, 还需进行深入的研究工作。动物致死试验方面, 大多数试验动物不够敏感, 英美选用的大白鼠虽然对毒素的敏感性很高, 注射后 1 ~ 3 小时引起死亡, 但种的特异性很强, 除了他们使用的 Fischer 344 种外, 其它也都不敏感, 在普遍使用上意义不大。苏联试验了一些动物, 试验结果认为, 毒素对实验动物不敏感。

我们选用乳鼠致死试验,动物死亡比较规律,结果如表 I~IV 所示,不但可以致死乳鼠,而且致死时间比较短,在 16~20 小时内即可得出实验结果。

关于血清学活性方面我们选用了琼脂双扩散法。如表 I~IV 结果所示,粗制毒素出现 1~2 条沉淀线,浓制毒素则可出现 2~4 条沉淀线。

1. 琼扩试验:

采用本组改进的平皿双扩散法,抗体选用本组制造的炭疽沉淀素血清(批号75001)。毒素和沉淀素血清均定量为 0.2 毫升加入,置 37°C,24 小时观察结果一次,48 小时判定结果。试验结果表明(表 IV),三批毒素 7601~7603,其 5,000 个菌体/毫升接种量组,粗制毒素琼扩效价为 5~10 单位/毫升,沉淀线 1~2 条;浓制毒素效价为 5~20 单位/毫升,沉淀线 1~2 条。其 50,000 个菌体/毫升接种量组,粗制毒素的琼扩效价为 5~10 单位/毫升,沉淀线为 1 条;浓制毒素效价为 20~80 单位/毫升,沉淀线为 2~3 条。其 500,000 个菌体/毫升接种量组,粗制毒素的琼扩效价为 10~40 单位/毫升,沉淀线为 2 条;浓制毒素效价为 80 单位/毫升,沉淀线为 3 条。可以看出,三种不同的接种量均可产生毒素,但其中以每毫升培养基中接种 500,000 菌体组效价最高,沉淀线条亦多。

2. 乳鼠致死试验:

乳鼠由本所动物室供给,日龄 15~20 天,体重 7~8 克。毒素注射量为 0.5 毫升,途径为后肢大腿内侧皮下。注射后定时观察注射局部反应及动物死亡时间。三种菌量接种组的粗制毒素未引起动物死亡。注射局部未见明显特异反应。浓制毒素 500,000 个菌/毫升量组,三批毒素致死效果明显,动物死亡规律,其浓缩倍数在 12.5 倍者,经 16 小时能全部致死试验组动物,注射局部可见明显水肿反应。动物死后剖检证明系炭疽毒素特异性死亡。其注射量少于 0.5 毫升,或毒素浓缩倍数低于 10 倍者,一般不引起动物死亡或部份引起死亡。

3. 家兔皮肤水肿试验:

家兔由本所动物室供给,体重 1,500~2,000 克,每批粗制毒素经生理盐水倍比稀释后(原浓度,1:2,1:4,1:8,1:16,1:32),各取 0.1 毫升皮内注射于家兔背部六个部位,同时取毒素制造用培养液 0.1 毫升作为对照。经 24 小时后观察反应,量取局部浸润反应大小。结果表明(表 IV),三批不同菌量接种组,其水肿范围为 0.2~2.2 厘米,反应不甚规律。皮肤反应量可由 10~320 单位/毫升,虽然在方法学上尚须作进一步的细致工作,但结果却显示三种不同菌量接种组均能引起明显皮肤反应,而且较之前两种检定方法敏感快速。

摘 要

本文报导了炭疽毒素的研制结果,采用我们实验选出的培养基处方,证明在产毒方面是可取的。比较试验了三株菌株,结果证明 Sterne 菌株产毒较好。接种用菌体培养物较国外用芽胞优越性多。接种量用 5×10^5 个菌较国外用 5×10^3 个芽胞产毒为

好。除菌过滤采用硅胶滤板的效能优于垂熔玻璃滤器。在除菌过程中不加10%健康马血清,也能获得满意结果。

在毒素检定方面,试用了三种方法:琼脂双扩散法测定毒素,证明至少含有三种抗原成份;家兔皮肤反应试验虽反应不够规律,但敏感性较琼扩为强;乳鼠致死试验测定毒力,证明是可行的。上述工作为研制炭疽抗毒素打下了基础。

表I 炭疽不同菌株产毒比较试验

菌种	批号	琼扩试验			家兔皮肤水肿试验			浓毒乳鼠致死试验		
		粗制毒素	单位/毫升	线条数	粗制毒素	单位/毫升	水肿大小(厘米)	浓缩倍数	死亡数/试验数	死亡数
Sterne (不分解蛋白)	7604	20	20	1	80	4	1.2~1.5	320	1.2~2.4	8.3 × 1/2 16~20
	7605	20	20	2	160	4	1.0~1.2	320	1.0~2.2	10 × 2/2 16~20
	7606	20	20	2	160	3	1.0~1.2	10	1.2~1.2	7.1 × 2/2 16~20
CTH-1 (不分解蛋白)	7604	10	10	1	80	4	1.2~1.5	320	1.0~2.0	6.6 × 0/2
	7605	20	20	2	160	4	1.0~1.2	320	1.0~2.8	10 × 0/2
	7606	10	10	2	80	3	1.0~1.6	10	1.2~1.2	6.25 × 0/2
A16R (分解蛋白)	7604	5	5	1	40	4	1.0~1.2	320	0.6~1.6	1.25 × 2/2 16
	7605	10	10	2	40	2	1.0~1.0	10	痕迹	5.9 × 0/2
	7606	5	5	1	80	3	1.0~1.0	10	1.0~1.0	6.25 × 0/2