

說 明

“促腎上腺皮質激素 (A.C.T.H.) 的制备及生物檢定”、“血清蛋白变性作用的研究報告之一——用几种不同的方法变性的血清蛋白免疫性質和物理化学性質的研究”、“蔬菜和茶叶中还原抗坏血酸、脱氢抗坏血酸和二酮古罗糖酸的測定”等三文曾刊载于“中国人民解放军医学科学院院刊”1956年第二期。

促腎上腺皮質激素(ACTH)的製備及生物檢定

徐宗稼 池芝盛 范啓修 夏壽萱

促腎上腺皮質激素 (Adrenocorticotrophic hormone; 以下簡稱 ACTH) 的臨床療效, 在應用的初期, 雖曾一度引起懷疑, 但經深入研究, 其價值是肯定的。如對若干原因不明的疾病, 如風濕病、風濕樣關節炎、紅斑性狼瘡、結節動脈周圍炎等, ACTH 有迅速的 (雖然不是永久的) 療效, 能使病人度過危險階段。對過敏性疾病——特別是致病因子可以除去的例子, 如某些藥品的過敏性皮炎, 收效很快。此外, 在傳染病中毒症狀十分嚴重時, 與抗生素合用, 亦有良好的效果。目前 ACTH 已被廣泛應用於臨床治療⁽¹⁾。

家畜腦垂體中, ACTH 的含量, 以豬為最高⁽²⁾。我國人民的肉食以豬為主, 過去均將腦垂體拋棄。以後如能用以製成藥品, 以滿足醫療事業的需要, 極有意義。就上海一地而言, 如以每日宰豬兩千隻計算, 則收集到的腦垂體, 可製得前葉乾粉 60 餘克, 用以製成 ACTH, 可得 25 國際單位裝的約 250 瓶。

本試驗係於 1953-1954 年中進行——製備部份根據 Payne⁽³⁾ Astwood⁽⁴⁾, Bartholomew⁽⁵⁾ 及李卓浩⁽⁶⁾ 等氏的報告; 檢定部分係根據 Sayers⁽⁷⁾ 等氏的方法, 加以綜合及改良。

ACTH 的製備

ACTH 的製備包括兩個部分: 即試驗材料的準備, 和 ACTH 的製備。試驗材料主要的是: 腦垂體前葉乾粉及氧化纖維。茲分述如後:

(1) 腦垂體前葉乾粉的製備⁽⁷⁾

自新鮮豬頭中取出腦垂體^[註一], 隨即投入無水丙酮中 (每 100 個豬腦垂體、約用丙酮 200 毫升)。過夜, 取出。將垂體前後葉分開, 置前葉於研鉢中, 稍加壓磨, 再置入同量的丙酮中, 過夜, 濾出, 研成細粉。用 80 號篩子篩過。置真空乾燥器中, 用固體氫氧化鈉為乾燥劑; 抽空, 使乾燥。裝瓶密

封, 保存於冰箱中。平均每 300 個垂體, 可得前葉乾粉約 10 克。

(2) 氧化纖維的製備

以洗淨的上等白棉花置於松香皂液中 [1% NaOH 水溶液加 0.5% (w/v) 的上等松香], 煮沸四小時, 並時時攪動。然後移置於 0.2% 的 NaOH 中, 煮沸 15 分鐘。再置於 0.1% NaOH 中煮沸 15 分鐘, 以除去大部分的松香皂。然後以蒸餾水洗滌數次, 直到洗液澄清為止。再將棉花浸在 1% 醋酸中二小時, 取出, 用蒸餾水洗淨, 於空氣中晾乾, 並用彈棉機彈鬆⁽¹⁰⁾⁽¹¹⁾。

【註一】新鮮豬腦垂體先由作者以採集方法指導上海市菜場豬頭商小組。做試驗時, 即委託豬頭商代為採集, 每個代價 1 分至 1.5 分。

取上述得到的乾鬆而均勻的棉花 10 克，置於 P_2O_5 真空乾燥器中乾燥之。翌日，取出，置於 1,000 毫升蒸餾燒瓶中。其裝置如圖 1：於 B 處置 P_2O_5 小船，以吸收氧化過程中所生成的水。

分，C 處用玻塞塞緊，密封。

然後從 D 處抽空，

將活塞 D 關閉。於 D

處裝一刻度管，放置二

氧化氮液體〔註二〕約

6.5 毫升。隨即將 D 開

啓，俟二氧化氮液體被

瓶內的真空吸入後，立

即將活塞關閉。二氧化氮液體入瓶後，立

即氣化，進入 A，與纖維相接觸。維持溫度

在 $21-23^{\circ}C$ ，約 16 小時。開啓活塞 D，抽

去瓶內多餘的氣體。然後由 C 處取出氧化

纖維，並用蒸餾水洗滌多次，直至洗液不使

藍石蕊紙變紅為止。最後用潔淨的紗布包

好，在通風而無直接陽光的地方風乾。再

置真空乾燥器內乾燥一夜。取出，用 Wiley

磨粉機磨成粉末。並用醋酸鈣法測定其羧

基含量〔註三〕。

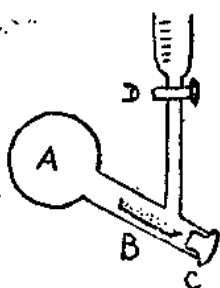


圖 1 氧化纖維製備裝置

(3) ACTH 的提取及精製

稱取豬腦垂體前葉乾粉 10 克，置於 500 毫升三頸燒瓶中。加蒸餾水 45 毫升，調成糊狀。加入冰醋酸 180 毫升，並用攪拌器不斷地攪拌。在水浴上加熱，直至溫度升至 $70^{\circ}C$ 為止；需時約半小時。待自行冷卻後，用水稀釋至 3,000 毫升。用離心機離心，棄去殘渣，得垂體粉抽出液。

取氧化纖維粉末約 5 克 ($-COOH$ 基的含量約在 12% 左右)，置熔結玻璃板漏斗

中，依次用蒸餾水、1N 鹽酸、蒸餾水及 0.1N 醋酸洗滌後，取出。放於垂體粉抽出液中，攪拌 24 小時。靜置冰箱中過夜。傾去上層大部分液體，用粗熔結玻璃板漏斗過濾。取出氧化纖維，棄去廢液。將氧化纖維用 0.1N 醋酸少許洗滌二次，再用蒸餾水洗滌一次。

將上述吸附着 ACTH 的氧化纖維，移置於一小熔結玻璃板漏斗中。用 0.1N 鹽酸 20 毫升浸漬一小時後，用水流抽氣管抽出洗液。後再加 20 毫升 0.1N 鹽酸於纖維上。如是浸洗數次，直至洗液不呈顯著的二縮脲反應〔註三〕為止。

將洗液合併，置沸水浴上加熱 $1\frac{1}{2}$ 小時，隨時攪拌，以便進一步破壞其他激素〔註四〕。置溶液於火棉膠袋中，在冰箱中進行透析（對蒸餾水）。火棉膠袋孔徑要較小，使透析時極大部分的 ACTH 不致逸出袋外；但氫離子得以順利通過，溶液的酸度得以降低。俟袋中溶液的 pH（氫離子濃度負對數值）降至 3 時，將溶液取出，置真空裝置中進行低溫濃縮，或於冰凍乾燥機中乾燥。

於濃縮液中（如經冰凍乾燥，則將所得的黃色粉末溶於少量 0.1N 醋酸中）加入預先冷卻的無水丙酮，使溶液中丙酮的濃度達到 98% 以上。靜置冰箱中過夜。取出，過濾。沉澱用冷卻的丙酮洗滌一、二次。溶解沉澱於 0.1N 鹽酸中，用 1N 氫氧化鈉中和至 pH3.0—3.5，並用沙氏過濾器 (Seitz filter) 過濾。用無菌操作裝瓶後，置於 $-50^{\circ}C$ 至 $-60^{\circ}C$ 的乾冰酒精中急速冷凍。置冰凍乾燥機中乾燥之。當進入乾燥機時，乾燥箱的溫度維持在 $-20^{\circ}C$ ，冷凝箱的

〔註二〕二氧化氮係用硝酸鉛加熱分解製得〔註二〕，生成的氣體經 P_2O_5 乾燥後，於低溫下冷凝成固體。再於氧氣流中重蒸餾一次，即得白色或微黃色的固體。臨用時，於室溫下溶為液體。

〔註三〕二縮脲反應測定蛋白質：先將腦垂體前葉的抽出液依照 Kjeldahl 氏法定氮，求出溶液的蛋白質含量，然後用此溶液配成各種蛋白質含量不同的溶液，加一定量的二縮脲試劑，於光電比色計上比色，繪製標準曲線。以後測定時，蛋白質含量即以比色讀數從標準曲線上求得。

溫度維持在 -40°C 左右。乾燥過程中真空度應在 50 微米以下。ACTH 乾燥後的粉末，應為白色或帶極微黃色的粉末。

在作者試製的過程中，得量的估計、第一是利用二縮脲反應的定量測定^[註三]，以測得蛋白質的含量。第二是作生物檢定，

以測定每毫克蛋白質所含 ACTH 的單位數。其試驗結果，見表 1。

由表 1 看來，可見我們自製品 ACTH 的效力約為腦垂體前葉乾粉的 50—60 倍。製造的最後得量約為腦垂體原含量的 13% 左右。

表 1. ACTH 製備過程中得量的估計

樣 品	蛋白質重量(毫克)	ACTH 單位(每毫克)	ACTH 單位總數
豬腦垂體前葉乾粉.....	10,000	0.17—0.20	1,700—2,000
氧化纖維的洗液.....	98—100	10.2	1,000—1,020
自製品 ACTH	75—80	10.2	765—816

ACTH 的生物檢定

ACTH 的生物檢定包括兩個部份：即測定所製備的 ACTH 的效力，及其純粹的程度。茲分述如下：

(1) ACTH 效力的測定方法

Sayers 氏的腎上腺抗壞血酸降低法是 ACTH 效力測定比較可靠的方法⁽⁶⁾⁽²⁰⁾。取 120—150 克雄性大白鼠，在恆溫 ($28 \pm 1^{\circ}\text{C}$) 環境中，用標準食料飼養 5—7 天後，施行腦下垂體切除術⁽²⁴⁾。經 38—46 小時⁽²⁵⁾，用乙醚麻醉⁽⁵⁾⁽¹⁶⁾，從左側脊椎部取出左側腎上腺。隨即從尾靜脈注射待試液；過一小時後，擊斃動物，再迅速取出右側腎上腺。兩側的腺體經剝離外部軟組織後，立刻用快速微量天秤稱其重量，準確度達 0.05 毫克。分別放入盛有 10 毫升 4% 三氯醋酸溶液及少量純淨細砂的圓底離心管中，用平底玻璃棒研磨。將離心管旋離 10 分鐘(每分鐘 2,000 轉)後，各吸取 5 毫升提出液，放入 18×180 毫米試管中。每管加入 1 毫升新鮮二硝基苯胍混合劑⁽²⁸⁾，搖勻後(空白管以 5 毫升 4% 三氯醋酸代替腺體提出液)，置入 70°C 恆溫水鍋中。加熱 30

分鐘後，即移入冰水槽中，並緩緩加入 5 毫升 85% 純硫酸。搖勻後，放置於室溫中 30 分鐘左右，即可用光電比色計 (Galenkamp 濾色板 625 號) 進行比色，以測定左右兩側腺體抗壞血酸的含量。右側腎上腺於注射待試液後，抗壞血酸的降低以每百克新鮮腺體抗壞血酸降低的毫克數表明之(簡稱毫克%)。實驗結束後，如發現某一動物尚有垂體的殘餘組織，則將記錄作廢。

(2) ACTH 單劑量測定法⁽²⁰⁾

將待試液配製成幾種濃度不同的溶液，使每 0.5 毫升含 0.0001, 0.0002, …… 0.0005, …… 國際單位。以四只大白鼠為一組。每百克體重注射 0.5 毫升稀釋後的待試液，進行效力測定。求其能使每百克新鮮腎上腺組織抗壞血酸降低至 60—100 毫克的劑量。此即所謂最小有效量。若其反應大於 100 毫克%，或小於 60 毫克%，則即表示各該劑量太大、或太小，應重新配製待試液。此法在製備過程中、作為樣品效力的初步估計，頗為方便。現將有關試驗記錄列於表 2。

[註四] ACTH 國際單位係以美國 Armour 實驗室所製造的為標準，即 1 毫克的 La-1-A 等於一個國際單位。據文獻所載，用其 0.5 微克即 0.0005 國際單位作效力測定，可得最小有效反應⁽²⁷⁾。

表2. ACTH 劑量測定結果

試驗日期	試驗樣品(自製品)	劑量(0.5毫升含蛋白質的微克數)	腎上腺抗壞血酸降低(毫克%)	動物數	備註
1953.7.8	粗 ACTH	4	133	4	
"	"	2	82.5	4	
11.5	純 ACTH	0.05	73	4	
11.14	垂體粉	5	121	3	
"	"	2.5	89	3	
1954.6.30	"	2.5	80	5	
"	洗液	0.05	109	6	
"	"	0.1	120	4	
7.21	純 ACTH	0.05	104	4	
"	"	0.1	126.7	4	
"	"	0.025	57	4	
7.22	"	0.1	141.7	4	
"	"	0.05	121.6	3	
"	"	0.05	77.3	3	冰凍乾燥不當
9.22	"	0.05	125.3	6	經酸處理
1955.4.6	"	0.05	55.3	6	

從表2可知:(1)同一樣品的不同劑量會引起不同的反應:大劑量引起大反應;小劑量引起小反應。(2)垂體粉在適當方法保存下,經過相當長的時間,其效力並不減弱。(3)自製品 ACTH 最小有效量為 0.05 微克,與文獻⁽⁵⁾所載的相一致。

(3) Organon ACTH 劑量反應標準曲

線的製定⁽⁷⁾⁽²⁷⁾

本研究因為得不到國際標準的 ACTH

(La-1-A),便只能採用市售荷蘭 Organon 廠出品的 ACTH (批號 276,014)作為本試驗的標準。該廠的製品每瓶含有 25 個國際單位。經過氮的微量測定後,確定每毫克蛋白質相當於三個國際單位。用以配成各種不同的劑量,進行效力測定,並導出它的劑量與反應的方程式如下:

$$Y = 51.165 + 48.36 X$$

(Y 為反應, X 為劑量的對數)。

現將試驗及統計數字列於表3。

表3. Organon ACTH 劑量反應

劑量 (國際單位) (每百克體重)	腎上腺抗壞血酸降低 (毫克%)	動物數	腎上腺抗壞血酸降低 的估計值(毫克%)	對曲線的離差
2.5/10,000	44.7±13.18	14	70.38	-25.68
5.0/10,000	86.3±15.44	12	84.97	+1.33
7.5/10,000	120.8±17.28	5	93.48	+27.32
10.0/10,000	123.4±44.29	10	99.53	+23.87
50.0/10,000	125.8±13.18	20	133.33	-7.63
200.0/10,000	151.1±18.48	19	162.44	-11.34
500.0/10,000	173.7±24.43	16	181.69	-7.99

曲線回歸(b) = 48.36;

估計誤差(S) = 21.10。

從表3所示,動物對小劑量的反應較

為敏感。因此,將曲線敏感段記錄製成表4,並繪成曲綫(圖2)。

表 4. 敏感曲線段內的劑量反應

劑量 (國際單位 每百克體重)	腎上腺抗壞血酸降低 (毫克%)	動 物 數	腎上腺抗壞血酸降低 的估計值(毫克%)	對曲線的離差
2.5/10,000	44.7±13.18	14	45.41	-0.71
5.0/10,000	86.3±15.44	12	87.70	-1.4
7.5/10,000	120.8±19.28	5	111.21	+8.59
10.0/10,000	123.4±44.29	10	129.61	-6.21

$$(b) = 139.21, \quad (S) = 7.6, \quad Y = -9.6 + 139.21X$$

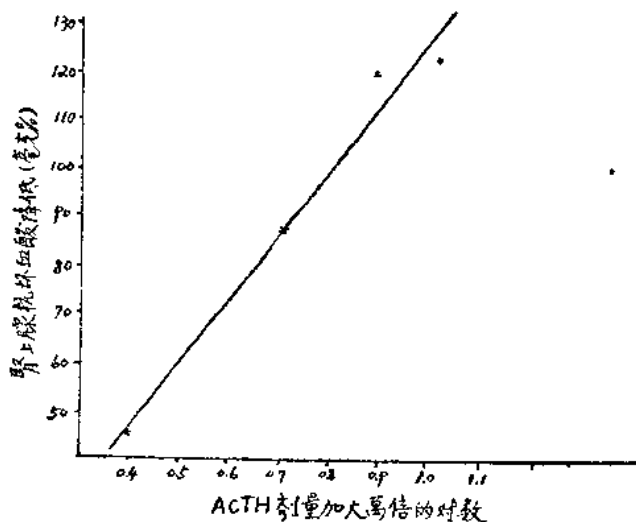


圖 2 敏感段的劑量反應曲線

(4) 自製品 ACTH 效力的測定

何級數，並使劑量大小落在上述曲線敏感段的範圍內，然後進行效力比較試驗。結果列於表 5。

將自製品與 Organon 製品各配成三種不同的濃度，使該劑量間的關係成為幾

表 5. 自製品與 Organon ACTH 效力的比較

劑量 (蛋白質微克數 每百克體重)	腎上腺抗壞血酸 降低(毫克%)	動 物 數	效力比較 ($\frac{\text{自製品}}{\text{Organon 製品}}$)	劑 量 比 例 ($\frac{\text{自製品}}{\text{Organon 製品}}$)
自製品 0.025	58.6	5	1.311	3.4
Organon 製品 0.085	44.7	14		
自製品 0.050	110.8	8	1.283	3.4
Organon 製品 0.170	86.3	12		
自製品 0.100	134.2	8	1.087	3.4
Organon 製品 0.340	123.4	10		

在本試驗三個劑量組中，Organon 製品的劑量均為自製品的 3.4 倍。自製品對 Organon 製品效力比較的均數 (m) =

0.0873；效力比較為 1.223；標準誤差為 0.0704。在 95% 機會中，其可信限為 92.4%—152.6%。現在 Organon 製品每

毫克蛋白質相當於 3 個國際單位,因此,自製品每毫克蛋白質應含 $3 \times 3.4 = 10.2$ 國際單位。

(5) 自製品 ACTH 中其他激素的測定

在多數試驗中,每只動物給予 50 個國際單位的 ACTH 自製品,作皮下注射。對照動物則給以相當於 50 個國際單位 ACTH 的市體粉末,或不給以任何處理,以作比較。有時亦以 Organon 製品為對照。

(甲)促性腺激素含量的測定⁽²⁰⁾ 取年齡 18 天的雌性小白鼠,每天由皮下注射 ACTH 二次,共計五次,總劑量為 50 個國際單位。於最後一次注射 24 小時後,取出其兩側子宮角,稱其重量。結果、證明自製品及 Organon 製品中的促性腺激素含量頗相近(表 6)。

表 6. 促性腺激素含量的測定結果

組別	動物平均體重(克)	動物數	子宮角平均重量(毫克)
空白	8.3	18	7.3
垂體粉	7.1	4	24.5
Organon 製品	7.2	2	12.0
自製品	7.1	6	10.2

(乙)促甲狀腺激素的測定⁽²¹⁾ 取 155 ± 15 克雄性豚鼠,每天由皮下注射一次待試物、歷時共五天,ACTH 總量為 50 個國際單位。第六天取出兩側的甲狀腺,稱其重量。結果、證明促甲狀腺激素的反應呈陰性(表 7)。

表 7. 促甲狀腺激素測定結果

組別	平均體重(克)	動物數	腺體平均重量(毫克)
空白	153.9	10	23.09
垂體粉	137.3	7	66.01
自製品 ACTH	149.4	8	25.30

(丙)生長激素的測定⁽²⁷⁾⁽²⁸⁾⁽²⁹⁾[註五] 取雌性大白鼠,年齡 26—28 天,經垂體截除 12—14 天後,每天由腹腔注射一次待試物,共四次,總劑量為 50 個國際單位。第五天取出一側的脛骨,劈為兩半,做成切片,在低倍顯微鏡下測定其非鈣化的骨骺部的闊度;闊度越大,表示生長激素作用越大。結果證明:ACTH 製品中的生長激素並不存在,或含量極微。惟因 ACTH 與生長激素有強烈的對抗作用,故尚不能作出肯定的判斷(表 8)。

表 8. 生長激素的測定結果

組別	垂體切除前平均體重(克)	注射後平均體重(克)	骨骺平均闊度(微米)	動物數
空白	63.5—73.5	68(67—68)	237	2
垂體粉	"	70(67—64)	338	3
自製品	"	67(65—72)	235	4

(丁)催產素測定⁽²¹⁾ 採用 130—150 克未懷孕的雌性豚鼠的子宮角做經體子宮收縮試驗,以垂體後葉素 (pituitrin-Parke Davis 公司出品) 為對照。結果證明:未經酸 (0.1N HCl) 處理的自製品一個國際單位中含有 0.012—0.018 個國際單位的垂體素;但經酸處理的自製品,其劑量雖增至 12.5 個國際單位,尚未發現有催產素(子宮收縮素, oxytocin)存在的現象。

(戊)抗利尿素的測定⁽²¹⁾⁽²⁹⁾ 取 120—150 克體重的雄性大白鼠,先在恆定環境中飼以標準食料,數天後進行試驗。試驗前 12 小時,禁食(飲水自由)。試驗時,每百克體重腹腔注射 10 毫升 0.2% 食鹽溶液,或在食鹽溶液中加入定量的 ACTH 製品(試驗組每只動物每百克體重受注 50 個

[註五]本項試驗按理應再截除動物的腎上腺,以免除 ACTH 與生長激素的對抗作用⁽²⁷⁾⁽²⁸⁾。但因試驗時缺乏皮質皮素 (Cortisone),動物多死亡,故改用此法。

表 9. 抗利尿素的測定結果

組 別	劑量 (單位/百克體重)	百克體重 6 小時 的尿總量(毫升)	每毫升尿的氯離子量 (毫克)	動 物 數
空 白 (1)		7.31	0.702	8
" (2)		7.08	0.933	4
垂體後葉素 (1)	1,000 mu. (即 1 i.u.)	2.24	9.093	4
" (2)	100 mu. (即 0.1 i.u.)	6.78	3.042	4
" (3)	50 mu. (即 0.05 i.u.)	7.60	1.099	4
自 製 品	50 個國際單位	7.08	0.690	4

國際單位 (ACTH), 每四只動物為一組, 在新陳代謝籠中繼續收集六小時的小便量, 並測定其中氯離子濃度。對照動物則在鹽水中加入定量的垂體素。試驗結果證明: 自製品 ACTH 並無抗利尿作用 (表 9)。

(6) ACTH 製品毒性試驗

取 25 克體重的雄性小白鼠靜脈注射 1 毫升待試液。以 Organon 製品為對照。試驗結果證明: 兩種製品在總劑量 50 個國際單位靜脈注射後, 小白鼠均呈程度相同

的輕微反應。在一周內並無死亡 (表 10)。

用豚鼠做試驗亦呈類似反應。

(7) ACTH 製品過敏性反應試驗

取約 200 克體重的豚鼠, 先由皮下注射待試物。經 14 天後, 再由靜脈內注射一次待試物。以 Organon 製品為對照。結果說明: 兩種製品均有致敏性。但因試驗數據太少, 尚不能作出肯定的結論。現將初步的試驗結果列作表 11。

表 10. 毒性試驗結果

組 別	劑量 (單位/每只動物)	動 物 數	平均體重 (克)	反 應
空 白	1 毫升 (溶劑)	6	26.3	輕發抖、數分鐘恢復
自 製 品	1 毫升 (50 個國際單位)	2	21	呼吸稍困難、數分鐘後恢復
Organon 製品	1 毫升 (50 個國際單位)	5	25.1	"

表 11. 過敏性反應試驗結果

組 別	動 物 體 重 (克)	皮下注射量 (毫克*)	靜脈注射量 (毫克*)	反 應
Organon 製品	240	4	16	抽搐; 未死亡。
"	245	4	16	五分鐘內抽搐, 死亡
"	238	4	16	"
自 製 品	250	4	11	呼吸困難, 不活躍
"	240	4	16	"

* 依小白鼠質量計算。

討 論

(1) 提取 ACTH 的方法頗多, 而以 Payne 氏⁽³⁾及李氏⁽⁶⁾的方法最為常用。當本實驗力開始時, 亦曾照上述二種方法各試做幾次, 但結果都不滿意。同時, 作者感到所用各種有機溶劑的數量太大, 而且溶

劑亦不易收回。因此, 作者便轉變為應用 Bartholomew 氏的方法, 用氧化鐵維丸提出 ACTH, 然後再用鹽酸液煮沸, 以破壞其他激素; 並用丙酮沉澱, 以除去黃色素及其他雜質。此種方法比較簡單, 不需要大

量的有機溶劑，費用較省，適合於我國目前的工業生產情況。

(2) 在氧化纖維吸附後的鹽酸洗液中，我們發現仍含有不少的其他激素。經於沸水浴上加熱處理 1½ 小時後，再做其他激素的生物檢定，即不呈明顯的反應。此種處理可能使 ACTH 部分水解。但是將受酸、熱處理過的溶液做腎上腺抗壞血酸降低試驗的結果，證明其生物效應並未因加熱而受損。此與李卓浩氏的報告是符合的^(9,10)。

(3) 用丙酮再沉澱的方法，以精製 ACTH 時，濾液和洗液均須預先冷卻。在過濾和洗滌的過程中，應經常保持漏斗中有很薄的液體層，以避免沉澱與空氣直接接觸。在用冷丙酮洗滌數次後，沉澱物須立即移入真空乾燥器中，抽空乾燥；或用水流抽氣管抽乾後，立即溶解於 0.1N 鹽酸中。否則 ACTH 極易被氧化，變為棕色而損壞。

(4) ACTH 原係較貴重的藥品，其生產與純粹化學藥品相同，多用規模較大的實驗室進行生產。本試驗操作手續簡單，得量較高，不需要冷室等設備。所以，如果就上述方法加以適當的擴大及改良，即可以用低廉的成本，生產臨床用的 ACTH。

(5) 在工業生產上，工作者可照李氏法⁽⁶⁾及 Bartholomew 法⁽⁵⁾，用冰凍新鮮的整只豬腦垂體代替腦垂體前葉乾粉。如此，可以不必分離腦垂體前、後葉，節省不少的人力。同時，丙酮乾燥及研粉的手續都可省却。但其他激素的含量，是否將因此而增多，作者尚未試驗過。在生產上，氧化纖維的製造可採用“循環氧化法⁽¹³⁾”，以代替上述的“靜置氧化法”。如此，製造氧化纖維所需的時間可以縮短，而所得的產量亦增多。氧化所需的二氧化氮，則可用工業用的二氧化氮液體，照 McGee 氏等⁽¹⁴⁾⁽¹⁵⁾的方

法加以重蒸餾，即得。

(6) 在提取 ACTH 的過程中，僅採用單劑量的測定法⁽²⁰⁾，即可滿足鑑定中間產品的要求。不過為準確了解最後製品的效力起見，則應採用一次多劑量測定法；並應與標準製品同時進行。作者因缺乏標準 ACTH 作平行比較測定，所以只能採用 Organon 標準反應曲線中的三個有關劑量與自製品作比較。所得的結果，雖不合理的標準，但亦能達到一定程度的準確性。主要的缺點是：標準反應曲線中的劑量組不夠多，而且每一劑量所用的動物數目亦太少；如此，就有可能增加試驗結果的誤差。

(7) 作者採用的大白鼠兩側腎上腺抗壞血酸的差別（垂體截除，但未注射待試液）為 $10 \pm 28.8\%$ （個別相差數字為 +45, +59, -20, -18, -2, +18, -12），其標準誤稍大⁽²¹⁾。此可能因動物非純種，或因試驗條件未能嚴格控制所致。在我們的試驗中，曾發現：當天氣變冷而保溫失效時，可以大大降低動物對於 ACTH 的反應性。因此，動物的種別和動物房的恆溫條件等，是必須予以嚴格考慮的。

(8) 文獻上，關於測定腎上腺抗壞血酸含量所採用的加溫條件，各不相同：Roe 氏⁽²²⁾用 37°C ，180 分鐘；Denis 氏⁽⁷⁾用 70°C ，30 分鐘；而李卓浩氏⁽³⁵⁾用 57.4°C ，45 分鐘。作者用純抗壞血酸結晶及正常大白鼠腎上腺提取液，重覆作實驗。所得曲線皆互相平行，而且極相近。因此，在作者的試驗中，為方便起見，便採用 Denis 氏方法。

(9) 在本實驗，大白鼠右側腎上腺的取出，係在乙醚麻醉下進行⁽⁵⁾⁽¹⁶⁾。動物平均於注射 ACTH 5 分鐘內開始清醒。若將麻醉時間延長到一小時（亦即 ACTH 在動物體內作用的全部時間），則所得的結果便

完全不同。動物在清醒狀態下的反應、較在麻醉狀態下為大。因此，麻醉時間及深度必須恆定，始能得到正確的結果。

(10) 作者認為：用 Sayers 腎上腺抗壞血酸降低法以測定 ACTH 的效力，可以得到較準確的結果。但因行施垂體截除手術的困難，使此法的應用受到極大的限制。蘇聯學者曾採用完整的幼年大白鼠為試驗材料，以甲狀腺重量低降的多少為檢定

ACTH 效力的標準⁽²⁰⁾。E. Endroezzi 氏⁽²¹⁾亦以完整的幼年大白鼠為材料，按照 Sayers 氏原法測定腎上腺抗壞血酸的降低，以測定 ACTH 的效力。此法所需動物數量雖較多，但應用却較方便。

(11) 近年來關於因注射 ACTH 而導致過敏性反應，甚至死亡的臨床報告頗多⁽²²⁾⁽²³⁾⁽²⁴⁾。因此，對 ACTH 製品的過敏性反應問題應加以注意。

總

結

(1) 用豬腦垂體，按照氧化纖維吸附的簡單方法，試製臨床用的 ACTH，在實驗室規模上，獲得初步成功。得量約為豬腦垂體前葉原含量的 43% 左右。

(2) 用 Sayers 腎上腺抗壞血酸降低法測定 ACTH 的效力，自製品每毫克蛋白質約含 10.2 國際單位。其效力約為豬腦垂體前葉乾粉的 50—60 倍。

(3) 自製品 ACTH 中，除含少量促性腺激素外（與 Organon ACTH 相仿），其他激素，如生長激素、促甲狀腺激素、抗利尿素及催產素等，均無明顯反應。

(4) 在大量注射後（每只動物一次靜脈內注射 50 國際單位），小白鼠對自製品與 Organon ACTH 均呈程度相同的輕微毒性反應，數分鐘後恢復正常。

誌謝 本研究工作在進行過程中，承林國鎬、朱壬葆兩位教授經常予以幫助。本文並承朱壬葆、劉士豪、薛仲三諸位教授校閱斧正：謹致謝意。

又，丁志耀、黃世蘭、劉開智三位同志亦曾擔任本實驗的部份工作。應附誌致感。

參 考 文 獻

- (1) A. A. Агабек: *Клиническая Медицина*, 22 (10), 19 (1954).
- (2) G. Pincus: *Recent Progress in Hormone Research*, v. 8, 1—73, (1952) Academic Press, USA.
- (3) R. W. Payne: *J. Biol. Chem.* 137, 719 (1950).
- (4) E. S. Astwood, M. S. Raben, R. W. Payne & A. B. Grady: *J. Am. Chem. Soc.* 73, 2969 (1951).
- (5) R. J. Bartholomew: *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* 83, 334 (1953).
- (6) C. H. Li, G. W. Liddle, W. O. Reinhardt, L. L. Bennett: *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* 78, 665 (1951).
- (7) J. H. Burn: *Biological Standardization*, p. 177 (1950), Oxford Univ. Press, London.
- (8) C. H. Li: *J. Am. Chem. Soc.* 72, 2815 (1950).
- (9) C. H. Li, W. O. Reinhardt: *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* 76, 836, (1951).
- (10) A. C. S. Report: *Ind. Eng. Chem.* 15, 748 (1923).
- (11) A. B. Corey, H. Le B. Gray: *Ind. Eng. Chem.* 16, 853 (1924).
- (12) G. Brauer: *Handbuch der Präparative Anorganischer Chemie*, s. 371 (1951) Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart.
- (13) E. C. Jackel, W. O. Kenyon: *J. Am. Chem. Soc.* 64, 121 (1942).
- (14) P. A. McGee et al: *J. Am. Chem. Soc.* 69, 355 (1947).

- (15) J. Martin: *Bull. Soc. Chim. France*, p. 520, (1951).
- (16) А. М. Броуде, Т. С. Сахадкая, Н. С. Серебряникова: *Бюллетень*, т. 19, 461—468, 1954.
- (17) 郭祖超: *醫學與生物統計方法* 正中書局 1938.
- (18) P. B. Hawk, B. L. Oser & W. H. Summerson: *Practical Physiological Chemistry*, 893, 12th edition. (1947) Blakiston Co. U.S.A.
- (19) B. N. Ghosh et al: *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* 79, 23 (1952).
- (20) C. H. Li: *J. Am. Chem. Soc.* 74, 2124 (1952).
- (21) C. W. Emmens: *Hormone Assay*, Academic Press, U.S.A. (1950).
- (22) D. Abelson, & D. N. Baron: *Lancet*, 263, 663 (1952).
- (23) D. J. Engle & L. Baker: *Physiological and Therapeutic Effects of Corticotropin and Cortisone*, Thomas, U.S.A. (1953).
- (24) E. Reid, J. Tarris: *The Rats in Laboratory Investigation* (1949).
- (25) E. Reid: *J. Endocrinology*, 9, 323, (1953).
- (26) L. Eilkins: *The Diagnosis and Treatment of Endocrine Disorder in Children and Adolescence*, 1st ed, U.S.A. (1950).
- (27) M. A. Sayer, G. Sayers & L. A. Woodbury: *Endocrinology*, 42, 382 (1948).
- (28) P. George: *Vitamin Methods*, Vol. 1, England (1950).
- (29) H. Silvette: *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* 45, 599 (1940).
- (30) Н. В. Михайлова: *Док. Акад. Наук. СССР*, Том LXXX VIII, 579 (1953).
- (31) E. Endroczi: *Acta Physiologica*, 4, 401 (1954).
- (32) Brain, H. R. Hill: *Lancet*, 266, 1218 (1954).
- (33) S. Ewift: *Ann. Allergy*, 12, 172 (1954).
- (34) H. F. West, G. R. Newns: *Lancet*, 262, 1308 (1952).
- (35) C. H. Li et al: *Acta Endocrinologica* 8, 247 (1951).

血清蛋白變性作用的研究報告之一——用 幾種不同的方法變性的血清蛋白免 疫性質和物理化學性質的研究

吳蔚 鮑忠祈 黃耀煌 程伊洪 林國鑄

我國生物化學家吳憲早在1931年就提出了蛋白質變性的理論⁽¹⁾。他認為蛋白質的變性作用是由於蛋白質分子中輔鍵的斷裂而引起的分子的重排。這種理論由於蛋白質化學的理論和研究的方法的不斷提高而更加明確。不同的物理或化學的變性方法引起了蛋白質分子特殊的立體構型的改變。這種改變反映在它的物理化學性質和生物活性的改變上。

爲了要尋求一種抗原性較小的醫用動物血清，我們初步採取了三種使血清蛋白變性的方法——就是鹼變性、葡萄糖加熱變性、尿素和硫脲變性。用牛血清、馬血清或血清白蛋白等做原料，依上述方法變性後，研究它的抗原性和毒性、或是它的物理化學性質，文獻上雖然已經有了一些記載，但是用豬血清做原料，依上述方法變性，記載却很少。同時，在文獻上，除了用尿素或鹽酸胍等變性蛋白所做的研究比較詳盡外，其他却比較偏重在動物試驗方面。我們的目的就是想從變性蛋白的免疫學性質、化學和物理化學性質改變等角度上來研究這個問題。

關於鹼變性蛋白的研究，1909年Wells⁽²⁾已經發現了卵白蛋白經鹼變性後，抗原性變小。後來Tenbrock⁽³⁾，Kahn

和McNeil⁽⁴⁾，Landsteiner和Barron⁽⁵⁾都證明了這一點。Johnson和Wormall⁽⁶⁾以馬血清爲原料，Davis和Eaton^(7,8,9)用牛血清白蛋白做原料，Arnow，Kazal和DeFalco⁽¹⁰⁾用乾牛血清做原料，都得到了抗原性較小的鹼變性血清蛋白。1943年，Lewis⁽¹¹⁾用馬血漿做原料，用0.5N氫氧化鈉在37°C時變性，結果、經1小時變性的血漿蛋白做豚鼠的子宮收縮試驗，證明已經沒有抗原性，而在較長時間（8小時以上）經鹼變性後，血漿蛋白產生了一定的毒性。Kazal等^(12,13)更進一步的肯定了Lewis的工作。但是他們用牛血清做原料，經1N氫氧化鈉在室溫時變性、從1小時到24小時，結果、經8小時變性的、仍有抗原性。經12小時變性的血清、沒有沉澱素反應，但是却產生了相當的毒性。換言之，他們還沒有找到一種既無抗原性、又無毒性的變性動物血清。1948年、謝少文等^(14,15)用馬血清用0.25N氫氧化鈉在37°C時經30天的變性後，得到一種抗原性較小的變性血清。這種血清對小白鼠和家兔都沒有毒性，但是對豚鼠却有顯著的毒性。由於這樣，還不能作爲一種醫用動物血清。上述工作大都偏重在動物試驗方面，對於鹼變性血清蛋白的物理化學性質方面的研

究、報道得很少。因此，我們就用豬血清做原料，經鹼變性後、一方面研究它的免疫性質和毒性，另一方面、測定一些化學和物理化學性質的數據，想在這幾方面找尋一些聯系，作為深入研究的一些參考。

用葡萄糖加熱法使血清蛋白變性，最初有 Lenggenhager⁽¹⁶⁾ 的研究。他的結果是：人和動物的血清中加入 10% 葡萄糖液，經乾燥，再溶解後，加熱到沸點，就沒有抗原性。但 Roost⁽¹⁷⁾ 在 5 星期後再注射時，仍有過敏性反應。Schwiegk, de Niederhausern 和 Meinzinger⁽¹⁸⁾ 用同樣方法，在不同的溫度（從 50°C 到 100°C）各加熱 5 分鐘，又在 100°C 時加熱、經過不同的時間，所得變性血清對豚鼠都有顯著的過敏性反應。假如溫度增高到沸點，那末產品的滲壓大大降低，失去了作為膠質輸液的價值。列寧格勒輸血研究所⁽¹⁹⁾ 用液體血漿或血清做原料，在氫離子濃度負對數值（pH）8 或弱酸性溶液裏加入葡萄糖溶液，用巴士德消毒法連續加熱三天，以後又應用同樣原理、作了改進（方法不詳）。但是根據我們的試驗結果，還是不能完全除去它的抗原性。我國魯夫⁽²⁰⁾ 也曾初步按照 Lenggenhager 的方法作了一些試驗。

Neurath 等⁽²¹⁾ 以及 Erickson 和 Neurath⁽²²⁾ 研究了馬血清白蛋白經尿素變性後、除去變性劑所得的“再生”（regenerated）蛋白的抗原性，發現它的沉澱素價只是原來的十分之一，但是它的特異性同原來的馬血清白蛋白的一樣、並沒有改變，並且是“在免疫學上等價的”（immunologically equivalent）（Marrack⁽²³⁾ 給予“免疫學上等價的”的定義是甲、乙二抗原對抗甲血清的沉澱素價完全相等，同抗乙血清也一樣，那末甲、乙二抗原就是“在免疫學上等價的”）。Martin 等⁽²⁴⁾ 却採用了原來抗原性比馬血清白蛋白小的牛血清白蛋白

做原料，用尿素和鹽酸胍做變性劑，得到了同 Neurath 等相似的結果。但是用尿素變性牛血清白蛋白所得“再生”蛋白的抗原性的減小，在統計學上、意義並不大，而用鹽酸胍變性的，它的沉澱素價只是原來牛血清白蛋白的 70%。這幾種抗原也都是在免疫學上等價的。Neurath 等⁽²⁵⁾ 又詳盡地研究了“再生”馬血清白蛋白的分子量，分子形狀和大小，二種馬血清“再生”蛋白的電泳性質^(26,27)，被胰蛋白酶消化的情況⁽²⁸⁾，並和原來馬血清白蛋白作了比較，發現二者雖有多方面的相似性，但並非相等，所以“再生”蛋白還是在變性狀態中。他們又用同樣方法研究了馬血清假球蛋白⁽²⁹⁾。Putnam 等⁽³⁰⁾ 研究了牛血清白蛋白在尿素和硫脲變性後產生的“再生”蛋白的物理化學性質，並同原來的蛋白作了比較，同 Neurath 等的結果相像。Schultze⁽³¹⁾ 用牛、馬等血清白蛋白的氫離子濃度負對數值增加到白蛋白的穩定限界（“stabilitätsgrenze”），在 57°C 時、用尿素變性、歷 96 小時，據稱：可以達到完全除去抗原性的目的。

總結上述許多文獻上的報告，我們知道上面所述的三種變性方法，都能使動物血清蛋白的抗原性減小一些，但是還都不能達到理想的境界，因此、這一方面的研究還需要作更進一步的探索。

在上列的許多報告中，我們鑒於鹼變性動物血清抗原性減低最顯著^(11,13)，所以首先採用了 Lewis⁽¹¹⁾ 的方法，加以改良，使豬血清變性。其實在這種條件下，豬血清可能不但被鹼變性，還伴隨着肽鍵的破裂。這可以由下面我們測定的鹼變性時間愈長、分子量愈小的事實得到證明。所以我們用‘鹼變性’這個名詞，不過是沿用文獻上的名詞，實際應該是‘鹼處理’。我們的工作同謝少文等氏⁽¹⁵⁾ 有相同的結果。就是經鹼變性的豬血清蛋白抗原性雖然有一些

減少，却對豚鼠產生了顯著的毒性，但是它的耐量比 Kazal 等報告⁽¹³⁾中所載的大。爲了要進一步了解這種變性血清，我們測定了一些物理化學常數。

我們曾經試用幾種化學方法再處理鹼變性血清，來期求能除去它的毒性，但效果不大。可能毒性的產生、同蛋白質經鹼作用後的特殊變化有關。

此外，我們又用其他二種變性方法——

就是葡萄糖加熱法、尿素和硫脲變性法——處理豬血清，希望能夠得到一種既無毒性、又無抗原性的醫用動物血清。結果、用這二種方法所得的變性血清的抗原性減少得不多。要徹底的求得這個問題的解決，必須對蛋白質和變性蛋白質的化學和物理化學性質跟它的構造和構型作進一步的研究，再進而探索它同生物活性的關係；這也是當前蛋白質化學的重要發展方向之一。

一 變性方法

〔原料〕 爲了適應我國供應情況，我們採用豬血清做原料。豬血清使用前、先經澄清用的 Seitz-K 濾板過濾。

〔方法〕 I. 鹼變性 主要是參考了 Lewis 的方法⁽¹⁴⁾來做的。豬血清在 0.5N 氫氧化鈉溶液裏經 37°C 保溫一定時間後、用等電沉澱法取得蛋白質。沉澱出來的蛋白質、原法用氫離子濃度負對數值 4.3 的檸檬酸——磷酸氫二鈉緩衝液洗滌二次至三次。我們因爲最近的文獻上^(24,33)講：‘檸檬酸對心臟有害，嚴重的甚至可引起死亡’。爲了避免用檸檬酸，曾經改用過水，或稀釋

的上述緩衝液洗滌（但在豚鼠毒性試驗中、不曾見有明顯差別）。洗後、把蛋白質重新溶解在稀氫氧化鈉溶液裏。溶解的時候，鹼變性時間愈短的、愈難溶解。最後調節至氫離子濃度負對數值 7.4。過濾，就成。除 37°C 以外，我們另採用 0°C 和 15°C 兩種溫度變性。但 0°C 變性的黏度很大，不適於作動物試驗，在 15°C 變性的、抗原性改變不多，所以我們沒有作深入的研究。在不同的條件下用鹼變性，我們一共得到 9 種樣品（表 I）。

表 I. 鹼變性血清

編 號	變 性 條 件		
	氫 氧 化 鈉 濃 度	溫 度	時 間
101	0.5 N	37°C	4 小 時
104	0.5 N	37°C	8 小 時
110	0.5 N	37°C	12 小 時
111	0.5 N	37°C	24 小 時
105	0.5 N	0°C	24 小 時
112	0.5 N	15°C	12 小 時
113	0.5 N	15°C	4 小 時
114	0.5 N	15°C	24 小 時
115	0.5 N	15°C	8 小 時

II. 葡萄糖加熱變性 沒有稀釋的血清在加熱到 70°C 以上時，就凝固、加入葡萄糖後，可以提高它的凝固溫度⁽¹⁵⁾。我們用不同的條件，像蛋白質濃度、葡萄糖濃度、

蛋白質和葡萄糖重量之比，不同的溫度和不同的加熱時間等，使豬血清變性得到下列結果（表 II）：

表 II. 葡萄糖加熱變性血清

編號	猪血清 (毫升)	葡萄糖 (公分)	水 (毫升)	血清蛋白與 葡萄糖 重量之比	水浴加熱溫度 (°C)			每次加熱 時間(小時)	外觀
					第一天	第二天	第三天		
165	100	2	—	7:2	60—75(15')	60	60	1	凝固
166	100	2	—	7:2	60—75(15')	75	75	1	凝固
167	100	2	—	7:2	60	60	60—80(2')	1	凝固
168	100	4	—	7:4	60—75(15')	60	60	1	凝固
169	100	4	—	7:4	60—75(15')	75	75	1	凝固
170	100	4	—	7:4	60	60	60—80(2')	1	凝固
171	100	7	—	1:1	60—75(15')	60	60	1	凝固
172	100	7	—	1:1	60—75(15')	75	75	1	凝固
173	100	7	—	1:1	60	60	60—80(2')	1	凝固
174	100	4	100	7:4	60—75(15')	60	60	1	凝固
175	100	4	100	7:4	60—75(15')	75	75	1	凝固
176	100	4	100	7:4	60	60	60—80(2')	1	凝固
177	100	7	200	1:1	60—75(15')	60	60	1	不凝
178	100	7	200	1:1	60—75(15')	75	75	1	不凝
179	100	7	200	1:1	60	60	60—80(2')	1	不凝
180	100	2	—	7:2	60—75(15')	—	—	1	不凝
181	100	4	—	7:4	60—75(15')	—	—	1	不凝
182	100	7	—	1:1	60—75(15')	—	—	1	不凝
183	100	4	100	7:4	60—75(15')	—	—	1	不凝
184	100	7	200	1:1	60—75(15')	—	—	1	不凝
188	100	8	200	7:8	75	60	60	1	不凝
190	100	8	200	7:8	60	60	60—75(15')	1	不凝
301	100	8	200	7:8	60	60	75	1	不凝
302	100	8	200	7:8	60	75	75	1	不凝
303	100	8	200	7:8	75	75	75	1	不凝
304	100	8	200	7:8	60	75	80	1	不凝
305	100	8	200	7:8	75	80	83	1	不凝
306	100	8	200	7:8	80	75	75	1	不凝

加熱溫度欄下括弧內數字係表示該溫度加熱的時間，單位以分鐘計。

由上述結果中，我們可以看到血清必須稀釋到原來的溶液的三倍以上，再加入了葡萄糖加熱，才不會凝固。

III. 尿素和硫脲變性 變性方法是採取了 Neurath⁽²⁵⁾ 報告中所述的方法來做的，但按照 Putnam⁽³⁰⁾ 方法，用醋酸調節氫離子濃度負對數值。尿素濃度為 $8M^*$ ；我

們所用的硫脲濃度為 $0.8M$ 。血清加好變性劑後，在室溫放置 24 小時，以後再用透析法除去尿素或硫脲。變性劑除去的完全與否，可以比較透析液同原來血清中的總氮量和酪氨酸之比而決定⁽³⁴⁾。透析液用冰凍乾燥法乾燥。

表 III. 尿素和硫脲變性血清

編號	蛋白質濃度 (g%)	尿素或硫脲濃度	變性時間	變性溫度
201	2	尿素 $8M^*$	24	室溫
202	2	硫脲 $0.8M^*$	24	室溫

* 克分子濃度。

二 變性血清蛋白的免疫性質和急性毒性試驗

I. 免疫性質

(1) 沉澱素價 經過鹼、葡萄糖加熱、或是尿素變性的豬血清，我們用‘環狀試驗法’測定它的沉澱素價。抗血清的製備，我們先採用的是 Boyd 氏法⁽³⁵⁾。方法是就一組為數在 3 隻以上的家兔、在第一星期的前三天，每天作靜脈注射血清一次，以後三個星期、每一星期的第一天作腹腔注射，第二、三天作靜脈注射。每次注射量：豬血清是 2 毫升，變性血清是 4 毫升（蛋白質濃度為 6%）。最後一次注射後的第七天、由心臟取血。另外，我們又參考了 Hektoen⁽³⁶⁾和 Proom⁽³⁷⁾的方法，用氫氧化鋁吸附抗原、由肌內注射的途徑使家兔免疫。這種免疫方法產生的抗體比較多。以抗豬血清為例、用前一種 Boyd 法所得的抗豬血清沉澱素價、最高的為 1:4,000，而用後一種免疫方法獲得的抗豬血清沉澱素價、竟高達 1:10,000。因此，我們選用後一種——也就是氫氧化鋁吸附抗原的方法、使家兔免疫，製備了豬血清 101、110、111、104、303 和 201 等幾種樣品的抗血清。方法是取一定量的血清、加以適量的新鮮製備的氫氧化鋁，在使血清蛋白被吸附後，加生理鹽液調勻，在家兔股部肌內注射 8 毫升（相當於原來血清 3—4 毫升），14 天後，取它的血清做環狀試驗，在室溫放置一小時，觀察結果。見表 1V。

(2) 瓊脂內擴散試驗 Ouchterlony (1919)^(38,39) 提出的瓊脂平板擴散試驗用作一種免疫分析方法，在近來、應用頗廣。它的主要原理就是利用各個抗原抗體成分在瓊脂板上擴散速度的差別和相互作用時最適濃度比的不同，使多抗原的沉澱系統得以分開，各個抗原與其相當的抗體在一定的位點結合而形成沉澱線條。並且亦可從

沉澱圖型上來鑑別兩種抗原或兩種抗體是否相同，或部份相同，還是完全不同。我們的三種變性血清也利用這試驗方法做了初步的研究。本試驗所用的抗血清也是用氫氧化鋁吸附抗原免疫法製備的。試驗的方法主要是參考 Björklund⁽⁴⁰⁾和 Wilson 等的方法而做^(41,42)的。瓊脂濃度 1.5%—2.0%。含氯化鈉 0.8%。氫離子濃度負對數值為 6。加有少量的乙基汞硫代水楊酸鈉，作防腐劑。在培養皿內，用模型製成有孔的平板。板上三個孔的排列，我們是採用 Wilson 等所建議的排列方式的。上面二孔都放滿抗原，下面一孔放滿抗血清。假如血清蛋白的濃度過低，加的量太少，那末沉澱線條不能全部出現，並且很模糊。我們用的抗原除豬血清外，其他變性血清蛋白的濃度都是 6%。抗原和抗血清用量都是 0.8 毫升。一次加畢，在室溫（28°—30°C）放置 6 天，到 10 天後拍照。圖型照片現在把它附列在下面。圖中（1）代表左上孔，（2）代表右上孔，（3）代表下面一孔。

豬血清經鹼、葡萄糖加熱或尿素變性後，它的特異性都有了程度不同的改變，表現在瓊脂擴散所形成的沉澱圖型上有差異。變性血清的抗原抗體沉澱線條數目比原來豬血清的少。鹼變性 12 小時的血清（111）同它的同種抗血清產生的沉澱只有一條（圖一、2），同抗豬血清、也有一條（圖一、3）。經鹼變性 24 小時的血清（104）同抗豬血清的沉澱圖型、同 111 的相像（圖一、5），但抗 104 同豬血清所產生的沉澱線條遠較抗 111 同豬血清的為淡，同時也較短，並且出現的時間也較遲；104 同抗 104 的沉澱線條却很淡而模糊，在照片上不能攝出（圖一、4）。在前面沉澱素價測定試驗中，104 同抗 104 環狀試驗為陰性，而抗

表 IV. 猪血清和變性血清的沉澱素反應

抗血清	免疫方法*	家兔數目	兔號	沉 澱 素 價 值						
				猪血清	101	110	111	104	303	201
抗猪血清	I	3	1	4,000	10	10	0	0	—	—
			2	2,000	0	0	0	0	—	—
			3	2,000	10	0	0	0	—	—
	II	2	1	10,000	20	20	20	20	4,000	4,000
			2	8,000	10	0	0	0	4,000	4,000
抗 101	II	2	1	1,000	1,000	—	—	—	—	—
			2	1,000	500	—	—	—	—	—
抗 110	II	2	1	50	—	1,000	—	—	—	—
			2	500	—	1,000	—	—	—	—
抗 111	I	4	1	50	—	—	40	—	—	—
			2	20	—	—	10	—	—	—
			3	50	—	—	40	—	—	—
			4	20	—	—	20	—	—	—
	II	3	1	—	—	—	0	—	—	—
			2	—	—	—	200	—	—	—
			3	—	—	—	200	—	—	—
抗 104	II	3	1	100	—	—	—	0	—	—
			2	200	—	—	—	0	—	—
			3	100	—	—	—	0	—	—
抗 303	II	3	1	4,000	—	—	—	—	1,000	—
			2	4,000	—	—	—	—	1,000	—
			3	4,000	—	—	—	—	2,000	—
抗 201	II	3	1	4,000	—	—	—	—	—	2,000
			2	4,000	—	—	—	—	—	2,000
			3	4,000	—	—	—	—	—	2,000

* 免疫方法 I: Boyd 氏法。

免疫方法 II: 氫氧化鋁吸附抗原法。

沉澱素價用環狀試驗法測定。數字表示抗原稀釋倍數。

104 同猪血清却在猪血清稀釋 100 倍時、仍然呈陽性。這和瓊脂擴散試驗結果、基本上是一致的。經葡萄糖加熱變性和尿素變性的血清的沉澱圖型的改變、不像鹼變性的改變那麼大 (圖一 6、7、8), 同抗猪血清作用所產生的沉澱線條比較多。並且這兩種變性血清和其同種抗血清或抗猪血清作用所產生的沉澱線條同猪血清和這些抗血清所產生的沉澱線條之間、有的是相連接

起來的。但在鹼變性血清的沉澱圖型中, 沒有這種現象。

(3) 過敏性試驗 取體重在 200 克到 300 克左右的豚鼠、分組進行各種變性血清的過敏性試驗。試驗方法有兩種: 第一種採用 Безредка 氏介紹的方法。就是用 0.7 毫克蛋白質就皮下致敏, 兩星期後、由靜脈注射 7.0 毫克蛋白質。第二種方法是用 10 倍於第一法的致敏劑量——就是 7.0