

鲎试验用细菌内毒素提制的研究

崔德泉* 费克芬* 王景宏** 邓金娣* 曹素英*

为了开展鲎试验方面的研究,必须具备有高致热活性的标准细菌内毒素。但由于国内没有标准的内毒素,对试验结果的比较造成了一定的困难。为此,我们采用了Westphal方法〔1〕并进行了改良,提制了几种革兰氏阴性杆菌的内毒素。通过比较试验,证明热酚三次水层法提制的大肠杆菌O₅₅B₅(44336)内毒素的收获量、对家兔的致热活性以及鲎试验的凝集活性均较高。并按同样的方法提制了大批量的内毒素79-1批做为鲎试验用的细菌内毒素参考标准样品,同时对其进行了化学成份及生物学活性等方面的检定,现将试验结果报告如下:

材料和方法

一、材料:

菌种:大肠杆菌O₅₅B₅菌号44336;大肠杆菌O₁₁₁B₄菌号44155;志贺氏痢疾菌号51570。

以上菌种均由卫生部生物制品研究所诊断用品室供给。

培养基:普通肉汤琼脂pH7.0~7.4。乙醇及酚均为分析纯。

二、内毒素的提取方法:

1.三次水层提取法:上述菌株的第三代37°C18小时培养物的菌悬液,放于带玻璃珠的250毫升采血瓶中,打碎菌团,通过消毒棉花纱布过滤,比浊浓度,使菌液每毫升含菌2000亿。将酚加热溶化,等量加入菌悬液中,放68~70°C水浴不断摇荡。30分钟后取出立即放冰水冷却。每分钟3000转离心20分钟,吸取水层放入透析袋中。再于瓶中补加生理盐水至原体积,摇匀。再置68~70°C水浴中30分钟,如此反复二次。将三次水层相合并,流水透析48小时。透析液经滤纸过滤,加入二倍量的95%乙醇,充分摇匀。待大量沉淀物析出后,每分钟3000转离心25分钟,弃上清。沉淀物用

蒸馏水洗于透析袋中,流水透析48小时。将透析液每分钟25,000转超离心90分钟,弃上清,再用蒸馏水洗下沉淀物,进行冷冻干燥。称重,定量分装于安瓶中。

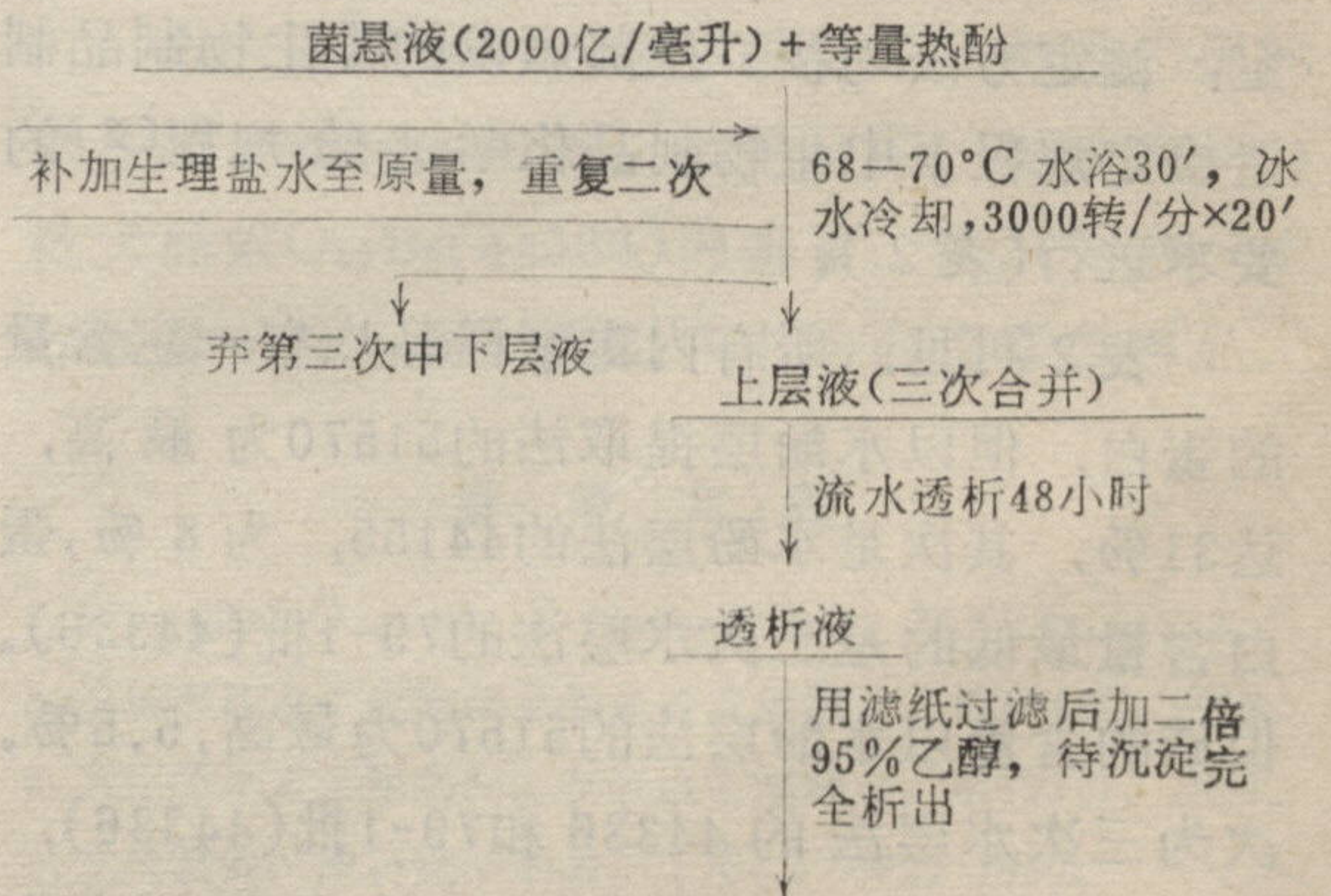
2.水酚层提取法:用上法相同的菌悬液加入等量90%的热酚,边加边摇,置68~70°C水浴15分钟,将混悬液倒入分液漏斗中,静置分层。取出酚层加入6倍体积的0.4%醋酸丙酮液,充分摇荡混匀,待其沉淀充分析出,倒入G₃玻璃漏斗抽滤,收集滤物溶于0.2M的磷酸缓冲液中。每分钟3000转离心5分钟,弃沉淀。上清液加入无水乙醇使其最终浓度为70%,充分摇荡,待沉淀物充分析出后,每分钟3000转离心15分钟。弃上清,用蒸馏水溶解沉淀,放入透析袋中。于4°C蒸馏水透析后,进行冷冻干燥,称重,定量分装于安瓶中。

3.一次水层及一次酚层提取法:将菌悬液加入等量的热酚置68~70°C水浴30分钟,冰水冷却,每分钟3000转离心20分钟使其分层后,分别取出水层及酚层,以下步骤均同三次水层提取法。

结 果

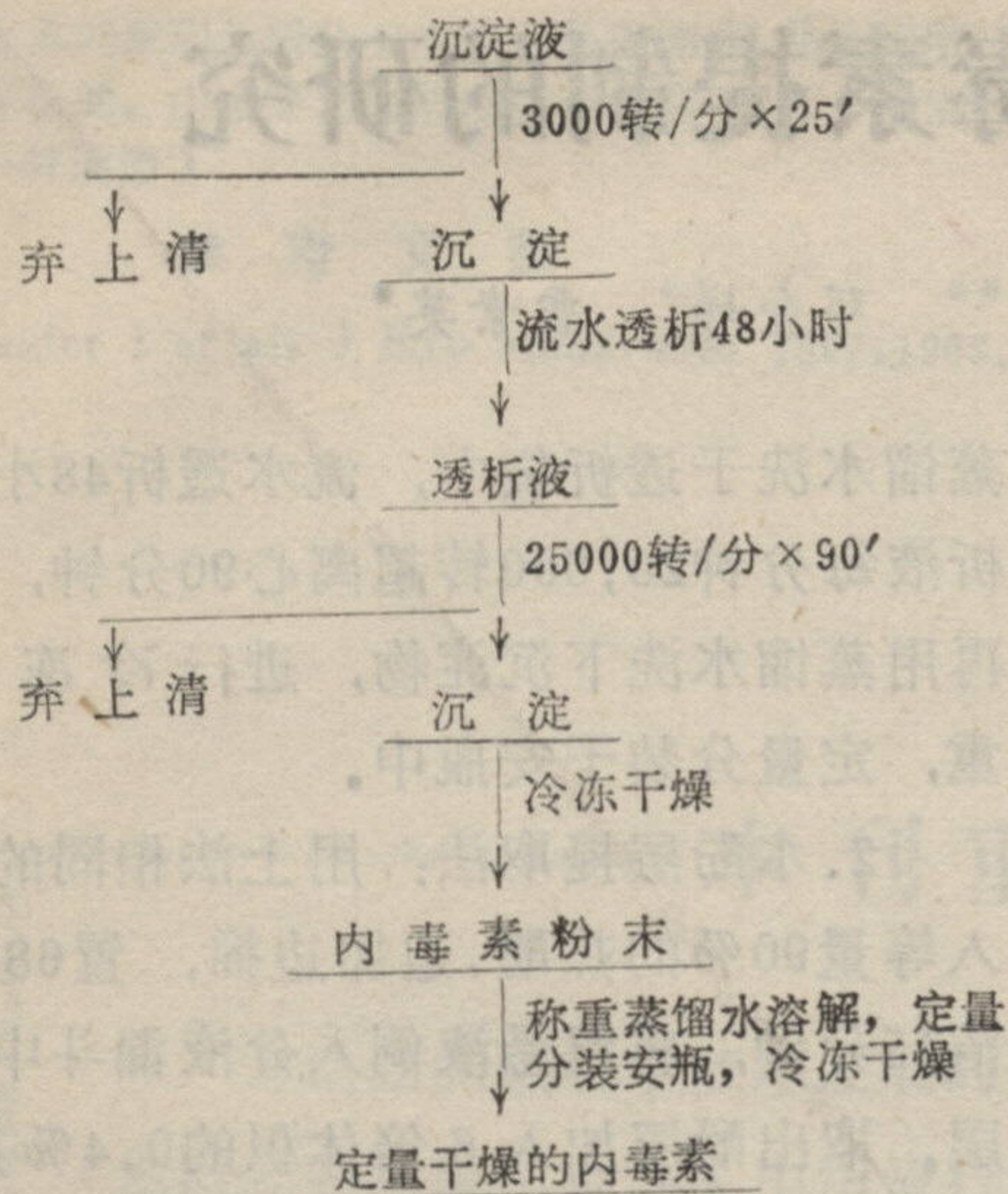
一、不同提取方法的内毒素收获量:不同

大肠杆菌内毒素三次水层提取法生产工艺流程



*卫生部生物制品研究所

**中国医学科学院流行病学微生物学研究所



提取方法所用培养基的克氏瓶数均为20瓶。所得菌悬液浓度每毫升为2000亿，除志贺氏痢疾菌株51570为80毫升外，其余均为100毫升(表1)。

表1 不同提取方法内毒素的收获量

菌株	三次热酚法	一次热酚法		水酚层法 (毫克)
	三次水层 (毫克)	水层 (毫克)	酚层 (毫克)	
44336	151.9	53.2	1.25	14.1
44155	59.3			38.6
51570	53.8			25.2

从表1中看出，在菌液量相同的情况下，44336三次水层提取法内毒素的收获量最多，而44336一次热酚法酚层的收获量最低。

二、内毒素的化学成份测定：

1. 内毒素样品中蛋白、磷、糖的含量测定：测定方法均按卫生部颁发的《生物制品制造检定规程》中生物制品化学试验规程〔2〕的要求进行(表2)。

表2可见，所有内毒素样品均有一定含量的蛋白，但以水酚层提取法的51570为最高，达31%，其次是水酚层法的44155，为8%，蛋白含量最低的是三次水层法的79-1批(44336)。但磷的含量以水酚层法的51570为最高，5.5%。次为三次水层法的44336和79-1批(44336)，2.8%和2.62%。而糖的含量所有样品都在12.3~24.5%之间。

表2 内毒素化学成份的含量

样品	提取方法	蛋白 (%)	磷 (%)	糖 (%)
44336	三次水层	7.0	2.8	18.7
44155	"	3.0	1.7	18.0
51570	"	4.2	2.08	20.25
79-1批	"	2.38	2.62	21.43
44155	水酚层	8.0	1.8	18.1
51570	"	31.0	5.5	12.3
44336	一次水层	7.3	1.7	24.5

2. 红外线吸收光谱：将提取的9个样品做了红外吸收光谱，结果均在1060cm⁻¹、1390cm⁻¹、1550cm⁻¹、1655cm⁻¹、2950cm⁻¹和3400cm⁻¹部位有吸收峰。与WHO内毒素参考标准品的红外光吸收图谱是相似的。(注：WHO的内毒素参考标准品的红外光图谱由卫生部药品生物制品检定所提供)。

3. 分子量：对三次水层法提取的79-1批内毒素样品，经分析超离心，测定沉降系数是25，其分子量为100万。

三、内毒素的生物学活性：

1. 致热活性(家兔法)：该试验系按卫生部颁发的《生物制品制造检定规程》中生物制品热原质试验规程〔3〕要求进行(表3)。

表3 几种内毒素家兔热原质试验结果

样品	提取方法	内毒素浓度(毫微克/毫升/公斤)		
		10	5	1
79-1批	三次水层	+	+	±
44336	"	+	+	-
44155	"	+	+	-
51570	"	-		
44336	水酚层	+		
44155	"	+	-	-
51570	"	+		
44336	一次水层	+		

注：阳性标准均以输液制品要求判定。

2. 鲨细胞溶解物试验(试管法)：试验方法及判定标准均见参考文献〔4〕(表4)。

表4结果看出：以79-1批内毒素(44336)灵敏度最高，0.1毫微克即可出现阳性反应。而51570三次水层最低，100毫微克才出现阳性反应。其余均为1毫微克。

3. 内毒素对家兔的致热活性与鲨试验结果

表 4 几种内毒素的鲎试验结果

样 品	内毒素浓度(毫微克/毫升)						双蒸水 对 照
	1000	100	10	1	0.1	0.01	
79-1批	卅	卅	卅	卅	卅	-	-
79-1批 上清	卅	卅	卅	卅	+	-	-
44336 (三次水层)	卅	卅	卅	卅	+	-	-
44155 (三次水层)	卅	卅	卅	卅	+	-	-
51570 (三次水层)	卅	卅	+	-	-	-	-
44336 (一次水层)	卅	卅	卅	卅	+	-	-
44155 (水酚层)	卅	卅	卅	卅	+	-	-

注: 该试验所用鲎细胞溶解物均为791-2批。

的关系一般认为是相关的。我们试验结果也证明: 鲎试验法与家兔法结果是平行的, 而且鲎试验法较家兔法灵敏度高10倍左右(表 5)。

表 5 鲎试验法与家兔法灵敏度比较

样 品	家 兔 法 (毫微克)	鲎试验法 (毫微克)	比差(倍)
79-1批	1~5	0.1	10~50
44336(三次水层)	5	1.0	5
44155(三次水层)	5	1.0	5
51570(三次水层)	>10	100	
44336(一次水层)	10	1.0	10
44155 (水酚层)	10	1.0	10

4. 小白鼠毒性试验: 将79-1批内毒素以不同的剂量对18~20克小白鼠进行直接尾静脉注射, 观察小白鼠的毒性反应。同时用死卡介苗及活卡介苗分别先行尾静脉致敏(0.75毫克/只)14天, 再以不同剂量的内毒素进行尾静脉攻击。结果均出现不同程度的松毛、拉稀及体重下降等毒性反应。但直接注射、死卡介苗致敏及活卡介苗致敏对小白鼠的最小致死剂量相差很大, 直接攻击时, 致死剂量为2000微克/只; 死卡介苗致敏14天攻击, 致死剂量为200微克/只; 活卡介苗致敏14天攻击, 致死剂量为25微克/只。

讨 论

一、关于不同提取方法及不同菌株内毒素的收获量: 我们比较了68~70°C热酚处理的3种提取内毒素的方法。从表 1 结果中证明: 几种菌株的内毒素收获量均以三次水层法最高; 在三次水层提取法中, 不同菌株的收获量也有

所不同, 以44336为最高。而一次酚层的内毒素产量最低。从而也说明了肠道菌中的内毒素主要存在于水层, 而不在酚层。

二、超离心速度与产量的关系: 三次水层法提取的最后步骤为25,000转/分钟, 超离心90分钟。我们在79-1批内毒素中发现, 虽经25000转/分钟, 超离心90分钟后, 取上清做鲎试验, 结果1毫微克/毫升的浓度仍出现阳性反应。说明上清液中还有许多内毒素成份, 从而降低和影响了内毒素的收获量。同时也说明了每分钟25000转90分钟超离心不能达到使内毒素都沉淀下来的目的。为了提高内毒素的收获量, 就必须进一步提高超离心速度和延长离心时间。

三、试验证明: 内毒素的致热活性家兔法与鲎试验法结果是平行的, 且鲎试验法较家兔法灵敏度高10倍左右。

四、众所周知, 小白鼠对内毒素是不敏感的, 小白鼠直接尾静脉内毒素攻击, 最小致死剂量要求很大, 直至每只小白鼠注射2毫克时, 才于24小时内死亡。经死卡介苗(0.75毫克/只)致敏14天内毒素攻击时, 200微克剂量可使小鼠全部致死。比直接内毒素攻击效果可提高10倍。而经活卡介苗(0.75毫克/只)致敏14天内毒素攻击时, 25微克剂量就可使小鼠在10个小时内全部死亡。12.5微克剂量部分死亡。比直接内毒素攻击效果可提高100倍。

结 论

本文对提制的内毒素进行了几种生化指标和生物学指标的检测。结果证明, 提制的79-1批大肠菌O₅₅B₅(44336)内毒素, 可做为进一步开展鲎试验方面研究工作中的内毒素参考品。

参 考 文 献

1. Westphal O et al: Z Naturforsch, 76: 148, 1952.
2. 卫生部颁发《生物制品制造检定规程》, 第194页, 1958.
3. 卫生部颁发《生物制品制造检定规程》, 第153页, 1958.
4. 王景宏等: 流行病学杂志, 1(3): 82, 1980.