

流行性感胃研究的实验室技术

II. 霍乱滤液的制备和应用

黄元桐 朱既明

(中央生物制品研究所, 北京)

在 1941 年發見了流行性感胃病毒的血球凝集現象以后^[1,2], 在病毒学技术中血球凝集試驗和血球凝集抑制試驗已被廣泛采用。可是由于正常人和动物的体液中存在一些不同性質和不同程度的非特异抑制素^[3,4,5], 在应用血球凝集抑制反应測定抗体时不能不首先考慮到除去非特异抑制素的問題。1947 年 Burnet 等^[6]制出霍乱弧菌培养物的濾过液, 用以破坏动物血清中的非特异抑制素, 后来并被其他学者所采用, 認為效果可以令人滿意^[7,8]。我們一年多來在研究流感病毒的实验中也使用了霍乱濾液, 其目的完全是为了实际应用, 并为了解决在制备霍乱濾液的过程中所遇到了一些問題, 也曾進行了若干試驗。下面提出了我們的关于制备霍乱濾液的一些实验結果, 并介紹了我們制备霍乱濾液的全部过程, 以供参考。

材料和方法

霍乱濾液

基本上按照 Burnet 等^[6] 1947 年所报告的方法制出。濾液經用賽氏濾板除菌后加入硫柳汞使最終濃度为 1:20,000, 置 0—5°C 冰箱中保存。

菌种

試制霍乱濾液的霍乱弧菌有 5、28、267、266 及 325 号五株菌种, 前三株属于小川型, 后兩株属于稻叶型, 但大多数試驗均应用 325 号菌种。保存菌种用冷冻干燥和培养基上定期傳代二种方法, 所用培养基的成分与產酶培养基相同 (見后頁), 做成斜面形式, 接种后置 35—37°C 培育箱中 12—16 小时, 然后保存于 4°C 冰箱中, 每周傳代一次。如產酶效价不好时, 則啓开干燥菌种应用。

血球懸液

各种动物血球, 洗滌三次, 每次皆用光电比濁計測定濃度, 按白來亨鷄血球的标准

曲綫制成 0.5% 血球懸液。

標示病毒

雞胚尿液病毒，試驗中病毒的劑量為 4 倍的血凝終點量，每次試驗中皆有病毒對照組，即將含有四單位的病毒液稀釋成 $1/1$ 、 $1/2$ 、 $1/4$ 和 $1/8$ 四管，測定血凝反應準確的結果，血凝終點應在第三管中出現，病毒量相差超過一管時，得重做全部試驗。

家兔血清

正常或免疫的家兔血清，皆以無菌操作分得血清，放 -35°C 冰箱中凍結保存。

霍亂濾液凝集血球試驗

將霍亂濾液作倍比稀釋，稀釋液用含有 0.1% 氯化鈣的生理食鹽水，每管 0.25 毫升，然後每管加入 0.5% 血球懸液，震搖混合後靜放室溫 45 分鐘觀察結果。

血球受體破壞酶 (RDE) 測定法

用 0.1% 氯化鈣鹽水將濾液作倍比稀釋，每管 0.25 毫升，於每管中加入 0.5% 雞血球懸液 0.25 毫升，混合後放置 37°C 水浴中 30 分鐘。從水浴中取出時應無血球凝集現象。再次搖勻血球，並立即於各管中加入含有 4 單位的 PR₈ 株甲型流感病毒 0.25 毫升，震搖混合後放置室溫 45 分鐘觀察結果。以完全不出現血球凝集的一管作為霍亂濾液受體破壞酶的效價。

霍亂濾液破壞家兔血清中非特異抑制素的效力試驗

將正常家兔血清分成甲、乙兩管，於甲管內加入 4 倍量的霍亂濾液，於乙管中加入 4 倍量的含有 $1/20,000$ 硫柳汞的生理食鹽水，分別搖動混合後，放置 37°C 水浴箱中過一夜，次日將兩管材料同時移放 56°C 水浴箱中，加溫 50 分鐘。隨後將兩管血清分別自 1:10 起作倍比稀釋，每管 0.25 毫升，並於每管中加入 0.5% 雞血球懸液 0.25 毫升，搖勻後立即於各管中加入 0.25 毫升含有 4 單位病毒量的 53-7 株 (1953 年北京分離的亞甲型流感病毒) 或其他亞甲型流感病毒懸液，再次混合後靜放室溫 45 分鐘觀察結果。以完全的血球凝集抑制終點為血清的效價。

霍亂濾液對流感抗體的損害性試驗

取流感家兔免疫血清 3—4 份，每份血清分成甲乙兩管，於甲管中加入 4 倍量的霍亂濾液，於乙管中加入 4 倍量的含有 $1/20,000$ 硫柳汞的生理食鹽水，混合後放置 37°C 水浴中過一夜，次日將兩管材料同時移放 56°C 水浴中加溫 50 分鐘，最後用相關的病毒抗原測知二管血清的血球凝集抑制效價，並比較觀察兩種處理方法所得的效價的差別。

實驗和結果

(一) 霍亂濾液凝集鷄血球現象

我們先后用不同的霍亂菌株和不同的培养基制出了五批霍亂濾液，發現霍亂濾液具有高度凝集白來亨鷄血球的作用（表 1）。由于这种凝集現象的存在，阻碍了受体破坏酶效价的測定。为了企圖解除这种障碍，曾進行了一些實驗，實驗結果表明：霍亂濾液中凝集血球的物質，能被 56℃ 加温半小时所破坏，在加有正常家兔血清的情况下，凝

表 1 几批凝集白來亨鷄血球的霍亂濾液

制 造 日 期			濾液 批号	制 造 菌 种	培 养 基			培 育		对白來亨鷄 的血凝效价
年	月	日			蛋 白 胨	瓊 膠	pH	温 度	时 間	
53	7	10	4	霍亂弧菌 325	華东, 2%	粒狀, 0.8%	6.8	37℃	16 小时	128
53	10	21	5	霍亂弧菌 267	蛋白胨 2%	青島 0.8%	6.9	〃	14 小时	512
54	2	27	6	霍亂弧菌 5	蛋白胨 2%	青島 0.5%	7.2	〃	18 小时	512
54	2	27	7	霍亂弧菌 28	蛋白胨 2%	青島 0.5%	7.2	〃	18 小时	512
54	3	25	8	霍亂弧菌 325	蛋白胨 2%	青島 1%	7.2	〃	18 小时	512

集現象能被抑制，这是与作者之一^[9]在 1948 年所报告的結果相符合的。此外，在一次試驗中我們發現霍亂濾液血球凝集素能在冷的情况下被白來亨鷄血球所吸收并在 37℃ 水浴中加温半小时后能从血球上釋放出來。各只白來亨鷄对霍亂濾液的凝集效价也很不一致，約在 40—1280 之間，但也有个别白來亨鷄血球不被濾液所凝集（見表 2）。

表 2 白來亨鷄个体血球对霍亂濾液的血球凝集效价

霍 亂 濾 液		白 來 亨 鷄 号						
批 号	制 造 菌 种	16	20	21	22	23	31	32
5	霍亂弧菌 267	1280	80	160	40	80	160	<5
4	霍亂弧菌 325	1280	160	320	80	160		
6	霍亂弧菌 5						80	<5

从表 2 中可見，白來亨鷄个体血球大多数都能被濾液凝集。以后我們采取了几种不同动物的血球，試驗它們对濾液的敏感性。表 3 中的結果表明，濾液对白來亨鷄和家兔的血球表現了最高的凝集，其他动物如澳洲黑鷄、豚鼠、火鷄以及人“O”型血球几乎完全不被凝集。根据本次實驗結果，在以后的實驗中我們完全改用澳洲黑鷄血球，先后使用十余只澳洲黑鷄的血球，于十余批霍亂濾液的實驗中，未再發現有濾液凝集血球的現象。

表3 各种动物血球霍乱滤液的血球凝集效价

霍乱滤液		动物红血球										
批号	制造菌种	火鸡 1	火鸡 2	澳洲黑 鸡 1	澳洲黑 鸡 2	澳洲黑 鸡 3	豚鼠 1	豚鼠 2	家兔 1	家兔 2	人“O” 型	白来 亨鸡
5	霍乱弧菌 267	<10	<10	10+	<10	<10	<10	<10	>1280	160	<10	320
4	霍乱弧菌 325	<10	10+	<10	<10	<10	<10	<10	>1280	20	<10	320

(二) 培养时间与产生受体破坏酶的关系

用霍乱弧菌 325 号菌种制出第 10、11 两批滤液，受体破坏酶的效价很低(表 4)，因此进行了不同培育时间的试验；第 14、16 两批滤液的结果表明，37℃ 培育 8—12 小时，所得滤液 pH 在 7.7 以下，受体破坏酶的效价已达到最高度，培育 18 小时后效价开始下降，培育至 24 小时滤液的 pH 上升至 8.35 或更高，受体破坏酶的效价几已完全失去。

表4 培育时间与产生受体破坏酶的关系

滤液		培养基			培 育		滤液 pH	受体破坏 酶效价
批 号	制造菌种	蛋白胰	琼 脂	pH	温 度	时 间 (小时)		
10	霍乱弧菌325	蛋白胰2%	青岛 1%	7.2	37℃	16	8.45	<5
11	"	"	"	7.4	37℃	17		<5
14	"	"	"	6.6	37℃	24	8.90	4
						18	7.60	256
						12	7.70	512
16	"	"	"	6.9	37℃	24	8.35	<2
						18	8.15	128
						12	6.40	512
						8	6.45	512

此后曾按培育 12 小时的方法制出滤液三批，受体破坏酶的效价均在 512 左右。

(三) 霍乱滤液中的防腐剂

我们曾于每批滤液中加入硫柳汞 1/20,000 作为防腐剂，在放置 37℃ 水浴中过一夜处理后，肉眼观察未见有细菌生长(尽量使用无菌材料和无菌操作)，各批滤液在 0—5℃ 保存 1—2 月，也未发现对霍乱滤液的效力有明显的损害作用。数批滤液过滤后尚残留有少数霍乱弧菌，但在加入硫柳汞后 1—3 天，再作无菌试验时已不能培养出生活细菌。

(四) 霍乱滤液对流感抗体的损害性试验

理想合用的霍乱滤液不但要求它很完全地破坏血清中的非特异抑制素，还必须对抗体没有破坏作用。某些作者也认为可以达到这个理想的目的^[7,8]。我们使用滤液以前，对每批滤液均进行一次对流感抗体的损害性试验，表 5 中列举了几批滤液的试验结果。

表 5 霍亂濾液對流感抗體的損害性(血凝抑制試驗)

霍亂濾液批號		病毒抗原	亞甲型流感病毒家兔免疫血清									正常家兔血清
8	-	53-7	(53-7甲) 640	(53-8乙) 320	(53-8甲) 320	(53-7乙) 320	(53-6甲) 320	(53-6乙) 640	(53-5甲) 640	(53-4甲) 320	(53-4乙) >1280	80
	+	53-7	640	200	120	320	80	640	320	240	960	<10
8	-	本病毒	(FM,甲) >1280	(FM,乙) 960	(52-1甲) >1280	(52-1乙) 960						80
	+	本病毒	>1280	640	960	800						<10
9	-	53-7	(53-7甲) 1280	(53-7乙) 480	(53-8甲) 480	(53-8乙) 1120	(53-6甲) 320	(53-6乙) 1280	(53-5甲) 1920	(53-4甲) 560	(53-4乙) 320	>20
	+	53-7	1120	480	320	480	120	960	640	320	320	<10
15	-	53-7	(53-7) 560	(53-6) 480	(53-4) 480							80
	+	53-7	480	400	240							<5
17	-	53-7	(FM,)* 320	(53-7) 200	(53-6) 280	(53-4) 200						160
	+	53-7	320	100	160	100						<5
19	-	53-7	(53-8) 120	(53-7) 200	(53-4) 200							80
	+	53-7	100	200	100							<5

注：‘+’一份血清加四份濾液，處理方法如同前述。

‘-’一份血清加四份硫柳汞鹽水。

* 與本病毒作試驗。

表中的 FM，為亞甲型代表株，53-4，53-5，53-6，53-7，53-8 均為 1953 年自北京分離的亞甲型。

要十分準確的測定濾液對流感抗體的損害性，目前技術上還有困難。但免疫血清經霍亂濾液處理後，其血凝抑制效價應與加鹽水同時處理的對照血清相近，或其下降程度不超過通常血清中可能存在的非特異抑制素的效價。此外，也應該考慮到試驗本身可能發生的差誤，在普通血凝抑制試驗中，我們認為結果相差一個稀釋度不能被認為是有意義的差別。

表 5 中的結果表明，各批濾液所用的多數血清，經濾液處理和未經濾液處理的血清效價都很接近，故我們認為這幾批濾液可以供給實際使用。

霍亂濾液常被應用於人血清的處理，為了進一步查明濾液對人血清中可能存在的，滴度比較低的抗體是否有損害作用，我們於已知的陰性血清中加入少量含有流感抗體的陽性人血清，經濾液處理後再檢查被加入的抗體是否有所損害(表 6)。

表 6 中結果表明：22 號人血清原對 53-7 抗原無抑制效價，人工混入少許 72 號人血清(約等於 $\frac{1}{15}$ 的血凝抑制效價)，經濾液處理後這樣少量的效價仍未見有失落現象。此外，21 號人血清原對 PR₉ 抗原無抑制效價，加入少量 74 號人血清後(約等於 $\frac{1}{20}$ 血凝抑制效價)，經濾液處理後，其對 PR₉ 抗原血凝抑制效價仍不低於理論上的要求。由

表 6 霍乱滤液对人血清中抗体的损害性(血凝抑制反应)

人 血 清	滤液处理(第17批)	病 毒 抗 原	
		甲 型 (PR ₀)	亞甲型 (53-7)
22	—		<10
22	+		<10
72	—		160
72	+		120
22+72 (7:1)	—		20
22+72 (7:1)	+		20
21	—	35	
21	+	<10	
74	—	240	
74	+	160	
21+74 (7:1)	—	70	
21+74 (7:1)	+	20	

此可見, 本批滤液对人血清中較低效价的抗体也沒有損害性。

(五) 霍乱滤液的制造和效力测定的方法

根据上列的實驗結果, 我們初步制定了一个制造和檢定霍乱滤液的方法, 按照这方法曾制造出若干批效果良好的滤液, 現將我們制造和檢定霍乱滤液的全部过程介紹如下:

1. 菌种 霍乱弧菌、稻叶型、菌株号 325, 冷冻干燥保存; 或在產酶培养基的瓊膠斜面上保存, 每周移种一次, 菌种斜面保存于 4°C 冰箱中。

2. 培养基

甲. 种子培养基

新鲜牛肉水(高压加热 2 次以下) 1000 毫升

純氯化鈉 5 克

蛋白胨 20 克

最后 pH 应在 6.7—6.9 之間, 分裝于中試管中, 每管 8—10 毫升, 10 磅 20 分鐘蒸汽滅菌。

乙. 產酶培养基(或供保存菌种用)

新鲜牛肉水(高压加热 2 次以下) 1000 毫升

純氯化鈉 5 克

蛋白胨 20 克

瓊膠 10 克

最后 pH 应在 6.7—6.9 之間, 每 200—300 毫升分裝一瓶, 10 磅 20 分鐘蒸汽滅菌,

在滅菌完畢後涼至 50°C 左右即傾成平板，每雙碟約 10—15 毫升，不宜過多。

供保存菌種用時，分裝成中管凝成斜面，保存於 4°C 冰箱中備用。

3. 種子液 將菌種移種於種子培養基內，應於 37°C 培養 8—12 小時之間供接種產酶培養基之用。

4. 接種產酶培養基 用毛細吸管吸取種子液，每平板滴上 2—3 滴，用“L”形玻棒塗布全培養基的表面，種子液不宜過多。

5. 培育 37°C 培育 12 小時，平板向上放置。

6. 過濾除菌 培養到時即從培養箱中取出全部培養基，平板上應有良好之菌苔而無雜菌污染。用無菌“L”形玻棒將平板上之菌苔盡量刮去。將刮去菌苔後的瓊膠搗碎，放於二層紗布內，在布氏漏斗上擠壓出培養基中的液體，每公升培養基約可取得 600 毫升培養基液體。將培養液放入每分鐘 4,000 轉的離心器中沉澱 15 分鐘，以除去絕大部分細菌。收集上清液用 EK 賽氏濾板過濾。濾液為透明深橙黃色，當日將濾液接種半固體和斜面培養基各二支試驗過濾除菌是否完全，隨後即加入硫柳汞溶液使成最後含量為 1:20,000，並將濾液放 4°C 保存。

為了保證安全，全部過濾除菌工作應在無菌室內進行，工作人員應穿著隔離衣，帶好口罩和橡膠手套。工作完畢後全部用具應經高壓蒸汽消毒。

7. 濾液凝集血球效價測定 測定方法已於上面詳述，採用澳洲黑雞血球，應不呈血球凝集現象。

8. 血球受體破壞酶效價測定 測定方法已於上面詳述，以本法測定受體破壞酶的效力，能因不同的標示病毒使結果有某些程度上的差別，我們經常以 PR₈ 株甲型流感病毒用作標示病毒，以方便比較各批濾液的效價，良好的濾液效價常在 200 以上。

血球受體破壞酶的效價不能最後決定該批霍亂濾液是否有效，僅有參考價值。

9. 霍亂濾液破壞家兔血清中非特異抑制素的效力測定 測定方法已於上面詳述，良好的濾液能將正常家兔血清中的非特異抑制效價完全破壞，即 1% 稀釋的處理後的兔血清，也不再出現血球凝集抑制反應。

根據我們的經驗認為家兔血清中的非特異抑制素是比較不易破壞的，對家兔血清有效的濾液，應用於處理人和其他數種常用的實驗小動物血清中的非特異抑制素，大致有效。但為確實起見，用於處理某種動物血清以前，應採取該種動物的正常血清數份，用濾液處理，以同樣方法，測定濾液對這種血清中非特異抑制素的破壞效力。

10. 霍亂濾液對抗體的損害性試驗 測定方法已於前面詳述。我們將霍亂濾液用於流感病毒的實驗，所以採用流感家兔免疫血清作為試驗的對象，最好採用 3 個以上家

兔的免疫前血清和免疫后血清，將每血清分成二管，一管加濾液處理，另一管加含 1/20,000 硫柳汞的鹽水作對照，同時進行試驗，經濾液處理后的免疫前血清的非特異抑制效價應低於 $1/10$ ，免疫后血清的血凝抑制效價應與未經處理的血清的血凝抑制效價相接近，即理論上應按下列公式：

未處理免疫血清效價 - 未處理免疫前血清效價（非特異抑制）= 處理后免疫血清效價
僅使用免疫血清進行試驗，結果比較不易判斷，已於前述（表5），此處不再重複。

討論和結語

使用各種方法和各種化學物品處理動物血清中非特異抑制素的研究，文獻中曾屢有報導，但霍亂濾液仍被病毒學者所常用，這可能由於霍亂濾液對處理各種動物血清的效力比較廣闊，而且也便於製造。我們基於實用的目的，對霍亂濾液中的某些問題未作深入研究。按照表4中的結果來看，除了培育時間與產生受體破壞酶有密切的關係以外，濾液的 pH 似乎也與受體破壞酶的效力有一定的聯繫，pH 8.35 以上的幾個濾液，受體破壞酶效價均很低，是否較高的 pH 直接破壞了受體破壞酶的效力，抑或霍亂弧菌在 pH 高時產生另一種物質而損害了受體破壞酶的作用，則是一個值得探索的問題。

純制的受體破壞酶不能破壞小白鼠血清中非特異抑制素的現象，曾經作者之一加以報導^[4]，我們在初步試驗中也得到了純制受體破壞酶不能破壞家兔血清中非特異抑制素的結果。粗制霍亂濾液能破壞小鼠、家兔血清中非特異抑制素而純制受體破壞酶則無效，這很容易使人推想到濾液中可能存在着一種受體破壞酶以外的物質，而由這一物質在間接或直接地發生破壞小鼠和家兔血清中的非特異抑制素的作用。為了對霍亂濾液的效力問題有進一步的了解，我們認為對這一現象加以深入研究將會有益。

總結上面的實驗結果和我們一年來製造霍亂濾液的經驗，可以得出下列幾點結論：

1. 用霍亂弧菌 325 號菌種，按照本文所介紹的製造方法，可以制出具有較高的受體破壞酶效價，能夠破壞正常家兔血清中非特異抑制素，並對流感抗體沒有明顯損害性的霍亂濾液。
2. 霍亂濾液對某些動物血球能表現出血球凝集現象，而對另一些動物血球則不發生血球凝集作用，採用澳洲黑雞血球可以免除濾液凝集血球的障礙。
3. 使用 1/20,000 硫柳汞作為霍亂濾液的防腐劑，對霍亂濾液的效力無顯著損害作用，並能在 1—3 天內殺死殘留濾液中的霍亂弧菌。
4. 每批霍亂濾液應通過檢定，證明無自然凝集血球現象，具有一定高度的受體破壞酶效價，能完全地破壞正常家兔血清中的非特異抑制素並對抗體沒有明顯損害性以後，

方能供給实际应用。

5. 实际应用霍乱滤液处理各种动物血清时，最好先测定一次本批滤液对这种动物血清的处理效果，至少应于每次处理血清时附加处理正常家兔血清一份，作为滤液的效力对照。

参 考 文 献

- [1] Hirst, G. K. *Science*, **94**: 22, 1941.
- [2] McClelland, L. and Hare R. *Canad. Pub. Hlth. J.*, **32**: 530, 1941.
- [3] Francis, T., Jr. *J. Exp. Med.*, **85**: 1, 1947.
- [4] Chu, C. M. *J. Gen. Microbiol.*, **5**: 739, 1951.
- [5] Sampaio, A.A.C. *Bull. World Hlth. Org.*, **6**: 467, 1952.
- [6] Burnet, F. M. and Stone, J. D. *Austr. J. Exp. Biol. and Med. Sci.*, **25**: 227, 1947.
- [7] Vander, Veen J. and Mulder, J. 1950. Studies on the antigenic composition of human influenza, A strains with the aid of hemagglutination-inhibition technique, Leyden Stenderd Kroese.
- [8] Appleby, J. C. and Stuart-Harris, C. H. *Britt. J. Exp. Path.*, **31**: 797, 1950.
- [9] Chu, C. M. *J. Hyg.*, **46**: 42, 1948.

LABORATORY TECHNIQUE IN THE STUDY OF INFLUENZA II. PREPARATION OF FILTRATE FROM CULTURE OF *V. CHOLERAE*

HUANG YUAN-TUNG AND CHU CHI-MING

National Vaccine and Serum Institute, Peking

Filtrates from the cultures of *V. cholerae* have been routinely employed in the removal of the non-specific inhibiting substances frequently present in the sera of animals. However, the details of the method of preparation are not easily available for the workers in this country, and so the authors made a study of various methods involved in this procedure. The following conclusions have been drawn:

According to the method outlined in the present report, a filtrate with high potency for the removal of the inhibiting substances but innocuous for the antibody of influenza virus has been obtained. In order to avoid the spontaneous hemagglutinating activity of the filtrate itself for certain breeds of fowls, the red blood cells of the Australian Black is recommended because of its lack of this conflicting feature. Merthiolate in concentration of 1:20,000 is recommended as a preservative, which has an additional advantage in killing the organisms within three days. Finally, it is recommended that each batch of filtrate be tested with known antisera, and in every test the normal rabbit serum be employed as negative controls.