

流行性感冒桿菌生長因素的研究

張寬厚 俞用川

(中國醫學科學院細菌及免疫學系)

流行性感冒桿菌的生長需要兩個生長因素,即 V 因子和 X 因子。血液和馬鈴薯中都含有這兩個因子^[1,2,3,4]。Lwoff 氏等^[5]認為 V 因子即輔酶 II。根據 Gingrich 氏等^[6]的報告,在促進流行性感冒桿菌的生長上,輔酶 I 比輔酶 II 和其他相近的化合物為優。許多微生物包括金黃色葡萄球菌、酵母等都能合成 V 因子^[1,4,7]。血液、亞鐵血紅素(Hem)、高鐵血紅素(Hematin)、氯化血紅素(Hemin)等都可以作為 X 因子的來源^[1,4,8,9]。

流行性感冒桿菌的分離和培養通常使用巧克力培養基。將羊血加於肝消化湯或其他基礎培養基中,在 80—90°C 的溫度下加熱 5—10 分鐘,使成巧克力樣棕褐色,即成巧克力培養基。製備這種培養基時需要血液,加熱的程度須加適,製成的培養基不能長時間保存,這些缺點都給化驗室工作增加了許多的困難。根據鄭效平^[10]的報告,將血液瓊脂用水蒸氣加熱 3—5 分鐘,可以代替巧克力培養基,但仍須使用血液。本試驗試圖製備粗製輔酶 I 和氯化血紅素,分別代替血液中的 V 因子和 X 因子;研究這些因子對於流行性感冒桿菌的生長和呼吸的影響;並希望在簡化流行性感冒桿菌培養基的製備方面,提供一些有用的資料。

材 料 和 方 法

輔酶 I 的製備 根據 Le Page 氏的方法^[11],由新鮮酵母中提取輔酶 I。其基本原理是:用 90—92°C 的熱水提出酵母中的輔酶 I,過濾,加鹼性醋酸鉛使濾液中的磷酸酯、蛋白質和其他雜質沉澱。於上清中加入硝酸銀,使輔酶 I 變為銀鹽,再用硫化氫使銀鹽分解。加丙酮即生粗製輔酶 I 的沉澱。用無菌蒸餾水配成 0.1% 的輔酶溶液,經蔡氏濾器過濾,並作無菌試驗後,存冰箱中備用。保存 3 個月後仍然有效。

氯化血紅素的製備 將脫纖血 100 毫升滴加於煮沸的 400 毫升冰醋酸和 0.1 克 NaCl 的混合液中,此時溫度須保持在 100—105°C,加熱 10 分鐘。放置過夜,用離心法收集沉澱。順次用 50% 醋酸、水、95% 酒精、乙醚洗滌沉澱。放乾燥器中乾燥後即得粗製氯化血紅素^[12]。用少量 1N 氫氧化鈉溶解之,加蒸餾水製成 1% 溶液。在 8 磅壓力下加熱 15 分鐘滅菌。在冰箱中保存 2 個半月後仍未失效。

基礎培養基:

(一)蛋白陳瓊脂 仿照 Vilter 氏等的方法^[13],由蛋白陳(proteose peptone) 2%、氯化鈉 0.6%、瓊脂 3% 製成。

(二)肝消化湯瓊脂 用豬胃和鹽酸使肝組織消化,再加瓊脂即成肝消化湯瓊脂^[14],

它是本系常規用巧克力培養基的基礎。

菌種：

(一)流行性感冒桿菌 是本系保存的菌種，接種於巧克力瓊脂斜面上，培養 24 小時後，將菌落移入 1 毫升生理鹽水中，製成均勻懸液，用劃綫法接種於試驗培養基上。每次試驗前均由血碟的衛星現象和塗片鏡檢，證明其確是流行性感冒桿菌後，再供使用。

(二)金黃色葡萄球菌 是本系保存的敏 1001 號菌種。觀察衛星現象時，在培養基上接種流行性感冒桿菌後，再在接種面上加種金黃色葡萄球菌，作一“十”字。如培養基中含有 X 因子，但沒有或缺乏 V 因子時，則流行性感冒桿菌不生長或生長很少；但在葡萄球菌“十”字形菌落的周圍，出現流行性感冒桿菌的菌落（原來不生長者，現在出現菌落；原來生長很少者，現在有了較多的菌落），這種現象叫做衛星現象。

將流行性感冒桿菌接種於各種試驗培養基上，在 37°C 溫箱中培養 24 小時，觀察菌落生長的程度。必要時（有時培養物生長較慢）在 48 小時再觀察結果一次。在盛培養皿的容器中，放置泡水的棉花一塊，增加環境中的濕度，可以加速本菌的生長。所有接種流行性感冒桿菌的培養基，其平面都加種金黃色葡萄球菌，用以觀察衛星現象。

輔酶 I 和氯化血紅素對於流行性感冒桿菌呼吸的影響，用 Warburg 氏呼吸器測定之。菌液的製備法如下：將流行性感冒桿菌在含有氯化血紅素 1 毫克、輔酶 I 5 毫克的 100 毫升肝消化湯中培養 24 小時左右，遠心沉澱，棄去上清，用生理鹽水洗滌菌體 3 次，稀釋至 15 毫升。用此菌液 1 毫升供測定氧消耗量之用。

結 果

試驗一

爲了解加熱對於血液中生長因素的影響，並試驗粗製氯化血紅素是否具有 X 因子的效用，我們用蛋白胰瓊脂做基礎培養基，加入各種分量的氯化血紅素、不加熱的血液，或加入血液後加熱 80°C 10 分鐘，然後接種流行性感冒桿菌和金黃色葡萄球菌。生長結果如表 1。

表 1 加熱對於血液中生長因素的作用

培 養 基 號	羊 血 %	粗製氯化血紅素 毫克 / 100 毫升	流感桿菌的生長	衛 星 現 象**
1	—	10	—	++*
2	—	1	—	+
3	—	0.1	—	—
4	5	—	—	++
5	5	10	—	++
6	5	1	—	++
7	5	0.1	—	++
8	5 (加熱)	—	+++*	—

* 十號的數目表示細菌生長的程度，或衛星菌落的多少。

** 沒有衛星現象表示兩種意思：(一)金黃色葡萄球菌菌落周圍沒有流感桿菌的生長；(二)培養基中 X 和 V 因子充足，在金黃色葡萄球菌菌落周圍和其他部分，流感桿菌的生長都非常良好，所以不呈衛星現象（如第 8 號培養基）。

上述結果指出,粗製氯化血紅素可以代替 X 因子,因為流行性感胃桿菌在僅含氯化血紅素的基礎培養基上不生長,但加種金黃色葡萄球菌(補充 V 因子)時呈現衛星現象(培養基第 1 號和第 2 號)。第 3 號培養基因氯化血紅素含量太少,所以細菌不生長,也沒有衛星現象。

流行性感胃桿菌在含有不加熱的羊血的培養基(第 4 號)上不生長;在該培養基上再加各種分量的氯化血紅素(第 5、6 和 7 號),流行性感胃桿菌也不生長;加種金黃色葡萄球菌時都呈現衛星現象。證明不加熱的羊血瓊脂培養基只含 X 因子, V 因子的作用被抑制。血液加熱後,抑制 V 因子的物質被破壞,所以不必加種金黃色葡萄球菌,流行性感胃桿菌即能生長(第 8 號)。

試驗二

加熱可以使抑制 V 因子的物質破壞,已見上述。為了確定在何種溫度下,加熱多少時間,對於流行性感胃桿菌的生長最為合適,我們將血液加入 56°C 左右的肝消化湯瓊脂中(盛於厚度和大小相近的錐瓶中),在不同溫度的水浴中,加熱不同的時間,倒於雙皿中,接種流行性感胃桿菌和金黃色葡萄球菌。並用巧克力瓊脂和血瓊脂做對照。試驗結果如表 2:

表 2 不同溫度和加熱時間對於血液中生長因素的影響

溫 度 (°C)	加熱時間(分)	流感桿菌的生長	衛 星 現 象
70	5	—	++
	10	—	++
75	5	+++	—
	10	++++	—
80、85、90、95、100	5	++++	—
	10	++++	—
巧 克 力 瓊 脂		++++	—
血 瓊 脂		—	++

由表 2 可以看出, 70°C 以下的溫度加熱 10 分鐘, 不足以破壞血中 V 因子的抑制物。在 75 到 100°C 的溫度下, 加熱 5 到 10 分鐘, 都可以放出血中的 V 因子, 使流感桿菌生長良好。

試驗三

為了避免製備流行性感胃桿菌培養基時加入加熱的血液, 我們將氯化血紅素和輔酶 I 加入蛋白胰瓊脂中, 接種流行性感胃桿菌, 發現生長的菌落比在巧克力培養基上生長的菌落為少。由染色檢查和衛星現象等證明它們確是流行性感胃桿菌。

為了弄清在含有氯化血紅素和輔酶 I 的蛋白胰瓊脂上流行性感胃桿菌生長不旺盛的原因, 究竟是由於粗製氯化血紅素或輔酶 I 的質量不好, 還是由於蛋白胰瓊脂的營養成分不如肝消化湯瓊脂。我們在這兩種基礎培養基中加入氯化血紅素和輔酶 I。培養結果如表 3。

結果指出, 在 100 毫升肝消化湯中加入血紅素 5—20 毫克和輔酶 I 2 毫克時, 流行性感胃桿菌生長旺盛(培養基第 1 號和第 2 號), 在菌落的大小和數量上和巧克力培養基(第

表 3 肝消化湯和蛋白胰在對流行性感胃桿菌的營養效能上的比較

培養基號	基礎培養基	羊 血 %	粗製氯化血紅素 毫克/100 毫升	粗 製 輔 酶 I 毫克/100 毫升	流感桿菌的生長	衛 星 現 象
1	肝消化湯瓊脂	—	20	2	++++	—
2	肝消化湯瓊脂	—	5	2	++++	—
3	肝消化湯瓊脂	—	20	—	—	++
4	肝消化湯瓊脂	—	—	2	—	—
5	肝消化湯瓊脂	5(加熱)*	—	—	++++	—
6	肝消化湯瓊脂	5	—	—	—	++
7	肝消化湯瓊脂	—	—	—	—	—
8	蛋白胰瓊脂	—	20	2	++	—
9	蛋白胰瓊脂	—	—	—	—	—

* 即巧克力培養基。

5 號)沒有什麼區別。蛋白胰瓊脂(第 8 號)的營養成分不如肝消化湯瓊脂,所以流行性感胃桿菌的生長較差。

試驗四

為了進一步研究培養基中氯化血紅素和輔酶 I 的含量對於流行性感胃桿菌生長的影響。我們用肝消化湯做基礎培養基加入不同分量的氯化血紅素和輔酶 I, 接種流行性感胃桿菌和金黃色葡萄球菌。培養結果如表 4。

表 4 氯化血紅素和輔酶 I 用量和流行性感胃桿菌生長的關係

粗製氯化血紅素 毫克/100 毫升	粗 製 輔 酶 I 毫克/100 毫升	羊 血 %	流感桿菌的生長	衛 星 現 象
5	5	—	++++	—
5	2	—	++	—
5	0.1	—	++	—
5	0.01	—	—	++
1	5	—	++++	—
1	2	—	+++	—
1	0.1	—	++	—
1	0.01	—	+	++
0.1	5	—	+	+
0.1	2	—	+	+
0.1	0.1	—	+	+
0.1	0.01	—	—	+
5	—	—	—	++
—	5	—	—	—
—	—	—	—	—
—	—	5(加熱)	++++	—
—	—	5	—	++

由表 4 可以看出, 每 100 毫升肝消化湯中含粗製氯化血紅素 1—5 毫克時, 輔酶 I 的用量愈多, 流行性感胃桿菌的生長愈好; 輔酶 I 的含量減至 0.01 毫克時, 生長很弱或不生長, 同時出現衛星現象。氯化血紅素的含量為 0.1 毫克時, 輔酶 I 的用量雖達 5 毫克, 並加種金黃色葡萄球菌, 生長仍然很差。

試驗五

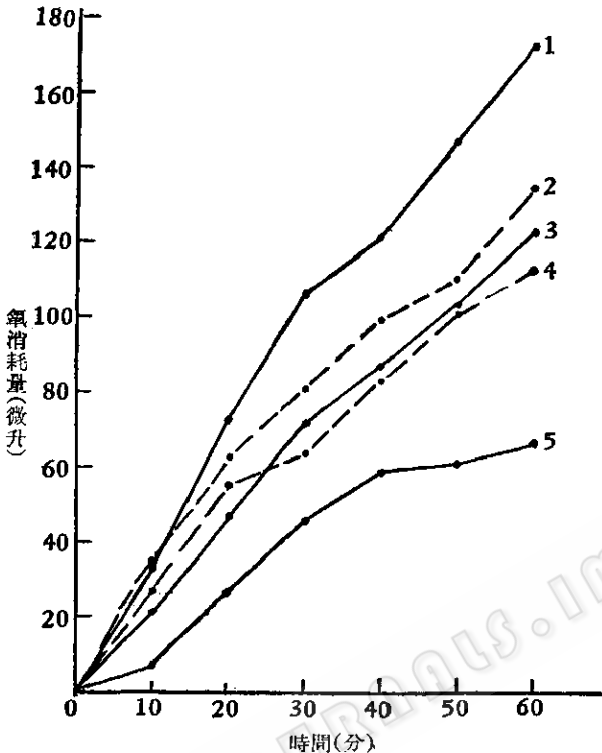
輔酶 I 和氯化血紅素可以作用 V 因子和 X 因子的來源,促進流行性感胃桿菌的生長,已可肯定。因為這兩個因子都是呼吸酶的輔基,和細菌的呼吸作用有一定的關係,所以我們用 Warburg 氏呼吸器測定輔酶 I 和氯化血紅素對於流行性感胃桿菌的氧氣消耗量的

影響。試驗結果見圖 1:

由圖 1 可以看出,流行性感胃桿菌對氧的消耗量,在巧克力肝消化湯中最大;在含輔酶 I 和氯化血紅素的肝消化湯中次之;在僅含輔酶 I 或氯化血紅素的肝消化湯中又次之;在單純肝消化湯中,流行性感胃桿菌的呼吸最弱。

討 論

加熱的血液含有 V 因子和 X 因子,是流行性感胃桿菌生長的必需要素;不加熱的血液就沒有這種功用。加熱究竟起了什麼作用? 目前尚無確切的說明。Casman 氏報告不加熱的血液中含有破壞 V 因子的系統,它的破壞作用和輔酶核苷酸酶(coenzyme nucleotidase)很相似^[15]。根據我們的試驗,在基礎培養基中加入不加熱的血液或氯化血紅素,或同時加入兩者,流行性感胃桿菌都不生長;補充輔酶 I 或加種金黃色葡萄球菌時,即能生長。這說明血液未加熱時血中 V 因子處於抑制狀態,但並沒有被破壞。加熱時此抑制物或核苷酸酶被破壞, V 因子被釋放出來。



基礎培養基(肝消化湯)加:

1. 加熱羊血 5%
2. 輔酶 I 150 微克 + 氯化血紅素 30 微克
3. 氯化血紅素 30 微克
4. 輔酶 I 150 微克
5. —

圖 1 加熱羊血、輔酶 I 和氯化血紅素對於流行性感胃桿菌呼吸的影響

在 75°C 到 100°C 的溫度下,加熱 5—10 分鐘,可以破壞此抑制物。

含有一定量輔酶 I 和氯化血紅素的肝消化湯,可以代替巧克力培養基,使流行性感胃桿菌生長,證實了輔酶 I 和氯化血紅素可以分別充作 V 因子和 X 因子。我們製備的輔酶 I 和氯化血紅素都是粗製品,因為沒有純品做比較,且限於設備,所以沒有測定它們的純度。

輔酶 I 是許多脫氫酶的輔酶。血紅素可作細胞色素、細胞色素氧化酶、過氧化氫酶、過氧化物酶的輔基。能還原硝酸鹽的硝酸鹽酶可能也是一種血紅素酶^[9]。大腸桿菌的細胞色素 b 也具有還原硝酸鹽的作用^[16]。這些酶類對於細菌的氧化過程具有重要的作用。輔酶 I 或血紅素本身不是能量的來源,也不是合成菌體的原料,所以培養基中除須含有適量的 V 因子和 X 因子外,尚須供給流行性感胃桿菌生長所需要的其他營養成分。我們的

試驗證明，肝消化湯的營養價值比蛋白胨為優，也說明了這一點。

流行性感胃桿菌的生長，在巧克力培養基上與含有輔酶 I 和氯化血紅素的肝消化湯培養基上，雖然看不出有什麼區別；但在氧消耗量上，前者比後者為多。可見血中尚含有其他促進細菌呼吸的物質，這物質是什麼？需要做進一步的研究。在單純肝消化湯中，雖然缺乏 V 和 X 因子，細菌不能生長；但因原來菌體內含有一定量的呼吸酶，所以尚能消耗少量的氧氣。

摘 要

血液中含有抑制 V 因子的物質，在 75—100°C 的溫度下加熱 5—10 分鐘，可以破壞此抑制物，放出 V 因子。

以一定量的輔酶 I 和氯化血紅素分別作為 V 因子和 X 因子的來源，加於肝消化湯中，可以代替巧克力培養基。

流行性感胃桿菌的氧消耗量，在巧克力肝消化湯中最大，在含輔酶 I 和氯化血紅素的肝消化湯中次之，在不含這些因子的肝消化湯中呼吸最弱。

輔酶 I 和氯化血紅素至少可以保存 2½ 月，若能大量生產，則配製流行性感胃桿菌培養基時，可以避免使用血液。這在簡化培養基的製備手續上，將有很大的好處。

參加本研究工作的技術員有楊燕玲同志和周魁君同志。

參 考 文 獻

- [1] Thjötta, T. & Avery, O. T.: *J. Exp. Med.*, **34**: 97, 1921.
- [2] —Ditto—: *J. Exp. Med.*, **34**: 455, 1921.
- [3] Vilter, S. P. et al.: *J. Lab. Clin. Med.*, **26**: 31, 1940.
- [4] Thomson, D. & Thomson, R.: *Ann. Pickett-Thomson Res. Lab.*, **9**: 288, 1933.
- [5] Lwoff, A. and Lwoff, M.: *Proc. Royal Soc. London, Series B.*, **122**: 352, 1937.
- [6] Gingrich, W. & Schlank, F.: *J. Bact.*, **47**: 535, 1944.
- [7] Wilson, G. S. & Miles, A. A.: *Topley and Wilson's principles of bacteriology and immunity*, p. 901, 1955.
- [8] Hoagland, C. L. et al.: *J. Exp. Med.*, **76**: 241, 1942.
- [9] Smith, W. et al.: *J. Path. Bact.*, **65**: 229, 1953.
- [10] 鄭効平：中級醫刊，(3)，33，1954.
- [11] Carter, H. E. & Ball, E. G.: *Biochemical Preparations*, **1**: 28, 1949.
- [12] Gilman, H. & Blatt, A. H.: *Organic Synthesis*, **21**: 53, 1951.
- [13] Vilter, R. W. et al.: *Am. J. Med. Sci.*, **197**: 322, 1939.
- [14] 謝少文、周輯五：林氏細菌學檢查法，35頁，1951.
- [15] Casman, E. P. *J. Bact.*, **53**: 561, 1947.
- [16] Sumner, J. B. & Somers, G. F.: *Chemistry and methods of enzymes*, 3rd ed., p. 231, 1953.

STUDY ON THE GROWTH FACTORS FOR *HEMOPHILUS* *INFLUENZAE*

CHANG KUANG-HOU and YU YUNG-CHUAN

Dept. of Bacteriology, Chinese Union Medical College, Peking

V and X factors in heated blood are essential for the growth of *Hemophilus influenzae*. The unheated blood contains an inhibitor for the V factor. This inhibitor was destroyed by heating at 75—100°C for 5—10 minutes.

Liver digest broth, with a certain amount of coenzyme I and hemin acting as V and X factors respectively, could serve as "chocolate" medium for the cultivation of *H. influenzae*. This made the addition of blood in the preparation of the medium for *H. influenzae* unnecessary.

The oxygen intake of *H. influenzae* in "chocolate" liver digest broth was the highest, that in the liver digest broth with coenzyme I and hemin was the next, and that in the liver digest broth only was the least,

Functions of hemin and coenzyme I for the bacteria were also briefly discussed.