

用明礬濃縮抗元來獲得 抗噬菌體血清的研究

徐令巽 馬樹俊 方 亮

(北京醫學院微生物教研組)

在實際診斷工作中,分離出細菌的陽性率不高,是否係因其中一部分細菌被其相對應之噬菌體溶解所致,是一個重要問題。故獲得較高滴度的抗噬菌體血清藉以中和噬菌體之溶菌作用,實為實際工作所需要。鄒洛身氏以鼠疫噬菌體(未經處理者)實行家兔靜脈注射可獲得較高滴度之抗血清。而我們在製備抗血清過程中,採用以明礬濃縮的噬菌體與未經濃縮的噬菌體免疫動物作比較,發現用濃縮者免疫動物所獲得抗血清滴度較未濃縮者為高,特別在早期可高出 2—3 倍。故在明礬濃縮噬菌體作抗元的基礎上,再進一步的改良免疫方法當可獲得更高滴度之抗血清。

本文僅就在抗鼠疫噬菌體血清的製備與滴定工作中所觀察到的一些問題,作一初步簡單總結。很多工作尚待進一步的探討。報告如下。

實驗材料與方法

(一)實驗材料

1. 培養基: 液體培养基: 普通肉湯培养基。
固體培养基: 血平皿或血清瓊脂平皿。
2. 菌種: 無毒鼠疫桿菌 (Otten 型) 24 小時培養物。
3. 噬菌體: 鼠疫噬菌體(實驗室保存者)經反覆增強後過濾獲得滴度為 10^{-8} 。
4. 用明礬獲得濃縮鼠疫噬菌體之方法:

表 1 滴 定 明 礬 用 量 法

	1	2	3	4	5	6
不同稀釋度之明礬溶液	5%	2.5%	1.25%	0.625%	0.3125%	0.156%
明礬溶液量(毫升)	2	2	2	2	2	2
鼠疫噬菌體量(毫升)	2	2	2	2	2	2
沉澱現象	—	++	+++	++++	—	—

以 ++++ 代表沉澱塊最多者。 — 代表無肉眼可見沉澱塊出現。

取不同稀釋度之明礬溶液加等量之鼠疫噬菌體,微微搖勻。在 10 分鐘後即可在比例恰當的等電點的試管中,逐漸出現肉眼可見之絮狀疏鬆塊狀物;半小時後可見此絮狀塊均

1958 年 4 月 5 日收到。

沉至管底，上液轉清(表 1)。其中以第 4 管出現絮狀物最早而量亦最多，故我們在以下試驗中所應用處理噬菌體之明礬濃度均為 0.625% 者。試驗證明絕大部分噬菌體皆隨沉澱沉下，而上清液中幾乎沒有噬菌體存在。故在免疫動物時我們均取下沉搖勻後用之，上清液棄去不用。

4. 試驗動物：家兔(體重約 1 ½ Kg)。

(二)實驗方法

1. 抗鼠疫噬菌體血清之獲得方法：取家兔 32 隻分為二批，一批注射未經處理之鼠疫噬菌體，另一批注射用明礬濃縮之鼠疫噬菌體。在每批中又採用靜脈法與皮下注射法二種途徑作比較。

免疫注射共分為 4 週期，每週期注射 5 次，每次間隔 4 天。在每次注射中所用劑量均採用二種方法作比較(我們自己的免疫方法與蘇聯 Я. И. Раутошштейн 氏方法^[1])。

我們的免疫方法注射劑量為：(第一種方法)第一次 2 毫升，第二次 2 毫升，第三次 2 毫升，第四次 2 毫升，第五次 3 毫升。

Я. И. Раутошштейн 氏免疫方法注射劑量為：(第二種方法)第一次 0.5 毫升，第二次 0.8 毫升，第三次 1.2 毫升，第四次 2 毫升，第五次 2 毫升。

將抗血清獲得方法詳列於表 2。

表 2 免 疫 家 兔 的 方 法

噬菌體	途徑	動物隻數	方 法	第一週期					第二週期					第三週期					第四週期				
				第 1 次	第 2 次	第 3 次	第 4 次	第 5 次	第 1 次	第 2 次	第 3 次	第 4 次	第 5 次	第 1 次	第 2 次	第 3 次	第 4 次	第 5 次	第 1 次	第 2 次	第 3 次	第 4 次	第 5 次
(1) 用明礬濃縮者	皮	4	第一種	2 毫升	2	2	2	3	2	2	2	2	3	2	2	2	2	3	2	2	2	2	3
	下	4	第二種	0.5	0.8	1.2	2	2	0.5	0.8	1.2	2	2	0.5	0.8	1.2	2	2	0.5	0.8	1.2	2	2
	靜	4	第一種	2	2	2	2	3	2	2	2	2	3	2	2	2	2	3	2	2	2	2	3
	脈	4	第二種	0.5	0.8	1.2	2	2	0.5	0.8	1.2	2	2	0.5	0.8	1.2	2	2	0.5	0.8	1.2	2	2
(2) 未經處理之噬菌體	皮	4	第一種	2	2	2	2	3	2	2	2	2	3	2	2	2	2	3	2	2	2	2	3
	下	4	第二種	0.5	0.8	1.2	2	2	0.5	0.8	1.2	2	2	0.5	0.8	1.2	2	2	0.5	0.8	1.2	2	2
	靜	4	第一種	2	2	2	2	3	2	2	2	2	3	2	2	2	2	3	2	2	2	2	3
	脈	4	第二種	0.5	0.8	1.2	2	2	0.5	0.8	1.2	2	2	0.5	0.8	1.2	2	2	0.5	0.8	1.2	2	2

[附] (1) 以後簡稱爲濃。(2) 以後簡稱爲稀。

2. 抗鼠疫噬菌體血清之檢查法(滴定法)

(1) 試管法：

取小試管一系列排於試管架上，以無菌吸管吸取滅菌生理鹽水 0.8 毫升置於第一管中，自第二管起每管加入 0.5 毫升。

吸取抗鼠疫噬菌體血清 0.2 毫升置第一管中。反覆吸勻後，自第一管吸取 0.5 毫升至第二管中，以下依此類推。如此則抗血清之稀釋度依次為 1:5、1:10、1:20、1:40、1:80、1:160……1:10280……。然後在每管中加入適當濃度之鼠疫噬菌體（我們試出以 10^{-3} 最好）0.5 毫升。

將上述血清噬菌體混合液置 37°C 2—18 小時後，再於每管中加入 2 毫升肉湯液及 0.1 毫升培養 24 小時之無毒鼠疫菌液。

每次尚有對照管 3 支

第 1 對照管中加入肉湯 2 毫升	}	噬菌體對照管
菌液 0.5 毫升		
噬菌體 0.5 毫升		
第 2 對照管中加入肉湯 2 毫升	}	抗血清對照管
菌液 0.5 毫升		
1:2 抗血清 0.5 毫升		
噬菌體 0.5 毫升	}	細菌對照管(以檢查細菌是否生長)
第 3 對照管中加入肉湯 2 毫升		
菌液 0.5 毫升		

將對照管及試驗管一併置 37°C 孵箱，過 18—24 小時後觀察結果。（陽性結果為由抗血清與噬菌體結合，故無溶菌作用出現）。

2. 平皿法：取已溶化好之瓊脂 6 毫升，待冷至 45°C 左右，加入馬血清 0.5 毫升及培養 24 小時無毒鼠疫菌液 0.3 毫升。搖勻，傾注倒入普通瓊脂平皿上層。待凝固後：

1) 可取已放置 2—18 小時之各種不同稀釋度之血清——噬菌體混合液 0.1 毫升，置於各平皿上，將其塗抹均勻。（此方法較可靠，即每平皿上祇塗一定量的一種稀釋度）。

2) 或藉標準白金耳鈞取已放置 2—18 小時之各種不同稀釋度之血清——噬菌體混合液於平皿上。（此方法可節省所用之平皿，因用此法在同一平皿上可滴定 6—8 個稀釋度之血清噬菌體混合液）。

對照試驗所用者與試管法同。

陽性結果為由抗噬菌體與噬菌體結合，因而中和噬菌體之溶菌作用，故無噬斑出現。

抗血清中所含抗鼠疫噬菌體抗體之滴度為最高稀釋度之抗血清仍能阻止噬菌體之溶菌作用者。

實 驗 結 果

(一)在獲得免疫血清過程中得出以下實驗結果：

1. 在注射的第一週期末（即給動物進行了 5 次注射之後），使動物休息 5 天，採血，析出血清，以試管法作滴定，得出：

以靜脈途徑進行免疫者：以“濃”（即用明礬濃縮之噬菌體）進行免疫者，獲得抗血清一般滴度為 1:40；以“稀”（未經處理之噬菌體）進行免疫者，一般滴度為 1:10。

以皮下途徑進行免疫者：以“濃”進行免疫者，一般滴度為 1:5；以“稀”進行免疫者，一般滴度為 1:2。

2. 在注射的第二週期末（進行注射 10 次後），取血清進行滴定，得出（仍為用試管法滴定者）：

以靜脈途徑進行免疫者——以“濃”進行免疫者，一般滴度為 1:640—1:1280；以“稀”進行免疫者，所得抗血清滴度為 1:320—1:640。

以皮下途徑進行免疫者——以“濃”進行免疫者，滴度為 1:40—1:160；以“稀”進行免疫者，滴度為 1:20—1:80。

同時用平皿法進行滴定时，得到之滴度平均較以試管法滴定时所得到之滴度高 2—3 管（即高 2—3 倍）。

3. 在注射抗元的第三週期末得到之抗血清滴度一般平均較第二週期末高 10—1000 倍，但在第三週期以後再繼續進行免疫注射時，抗體滴度則不再上昇，時久後反而下降。

以上試驗的平均結果，總結於圖 1。

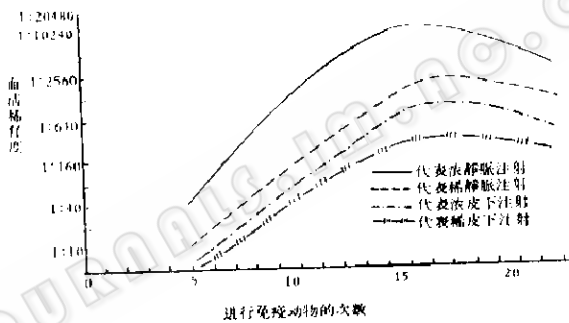


圖 1 用不同抗元不同注射方法的平均結果（試管法）

由圖中結果可得出以下結論：

(1) 在抗鼠疫噬菌體血清製備過程中，用明礬濃縮之噬菌體較未經處理者免疫所獲得抗體滴度在早期較高，以後則無顯著區別。

(2) 靜脈注射法較皮下注射法好，可以獲得較高滴度之抗噬菌體血清，尤以早期更為顯著。

此外，在免疫過程中，未發現蘇聯 Я. И. Раутенштейн 氏所提出方法與我們所用免疫方法所獲得抗體滴度有何顯著區別。用平皿法作試驗時每次滴度都較試管法要高 4—8 倍。

(二) 在滴定抗鼠疫噬菌體血清過程中發現：

1. 所用噬菌體之稀釋度不同時，則所得抗體之滴度不同。

我們曾反覆用噬菌體原液及 10^{-1} ... 10^{-5} ... 各種不同稀釋度的噬菌體滴定抗噬菌體血清，觀察出當噬菌體稀釋度逐次增加時，滴定出抗血清之滴度亦逐較高，而以 10^{-5} 的鼠疫噬菌體濃度（即含 1000 個溶菌量）最恰當（此噬菌體之滴度為 10^{-8} ）。如噬菌體稀釋過高時（即少於 1000 個溶菌量時），則試驗結果不準確。舉例（見表 3、4）。

由上例及圖 2 曲綫可看出：隨噬菌體稀釋度增加，而抗體滴度遞次增加，而以 10^{-5}

表 3 不同稀釋明礬濃縮噬菌體滴定抗血清的結果

噬菌體 \ 血清	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280	1:2560	1:5120	1:10,240
原液	+	+	+	±	-	-	-	-	-	-	-
10 ⁻¹	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
10 ⁻²	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
10 ⁻³	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
10 ⁻⁴	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
10 ⁻⁵	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-

[附] “+”代表液體混濁，細菌繁殖，由於抗噬菌體結合了噬菌體之故。

“-”代表噬菌體顯示出溶菌作用。

表 4 不同稀釋普通噬菌體滴定血清的結果

噬菌體 \ 血清稀釋度	1:5	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160
原液	±	-	-	-	-	-
10 ⁻¹	+	-	-	-	-	-
10 ⁻²	+	±	-	-	-	-
10 ⁻³	+	+	-	-	-	-
10 ⁻⁴	+	+	-	-	-	-
10 ⁻⁵	+	+	+	-	-	-

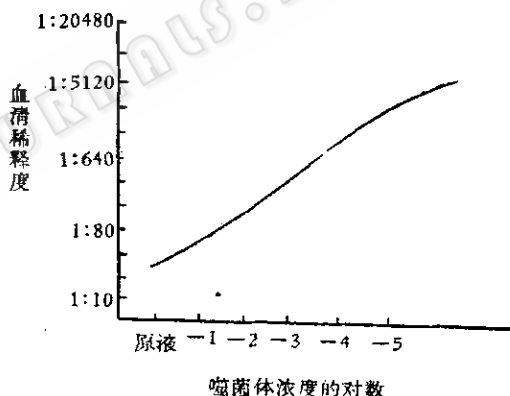


圖 2 抗元稀釋和抗血清滴定的關係

為最好，故上述實驗結果中所獲得抗體滴度皆為用 10⁻⁵ 稀釋度之鼠疫噬菌體滴定所獲得者。

此外我們也觀察到：

1. 在不同溫度下滴定抗鼠疫噬菌體血清時，發現室溫(18°—22°C)較 37°C 好。在室溫條件下可滴出抗噬菌體之最小作用量，但出現實驗結果之時間則較 37°C 為晚，一般需 48 小時後。

2. 在滴定抗鼠疫噬菌體血清時，發現噬菌體與抗體相加後作用之時間不同時則所得抗血清滴度亦不同。我們採取了作用 2 小時及作用 18 小時者二種方法作比較；一般後者較前者高 10 倍左右。故我們在試驗中所採用二者之作用時間均為 18 小時者。

討論及結論

1. 我們初步試用合適濃度 (0.625%) 的明礬濃縮鼠疫噬菌體後，進行家兔的靜脈免疫，可獲得較高滴度之抗噬菌體血清；尤以早期為顯著。

鄒溶身氏實驗所獲得抗噬菌體血清滴度雖有 1:160 到 1:20,480 不等，但大多為 1:2560 到 1:10,240 之間；且其實驗所用噬菌體之溶菌效價為 10^{-10} 以上，而我們所用者僅為 10^{-8} 。故如採用溶菌效價較高之噬菌體再以濃縮法處理後進行免疫，當能獲得更高滴度之抗噬菌體血清。

2. 按鄒溶身氏實驗材料得出，抗噬菌體血清對噬菌體發生中和作用而消滅其活動能力，在較高溫度比低溫要快得多。但我們得出在室溫 (18° — 22°C) 時較在 37°C 滴定抗噬菌體血清更精確。我們初步考慮是否因在 37°C 時細菌及噬菌體繁殖均較快，因而減少抗噬菌體血清之中和能力。

3. 至於為何在整個數十次的滴定工作中均發現固體平皿法比液體試管法滴定度高 4—8 倍問題，尚有待進一步探討。但為試驗準確起見，二種方法同時應用是必要的。

4. 我們所用之平皿滴定法似較鄒溶身氏之直線法較好，雖操作方法略繁，但觀察結果時非常清楚，並無觀察溶菌界限上的困難。

參 考 文 獻

- [1] Я. И. Раутенштейн.: Бактериофагия: общие сведения о явлении фагии и его значения в ряде производств. Издательство Академии наук СССР, Москва, 1955.
- [2] 路里：防治醫學，1: (4) 1951.
- [3] 屠曼斯基：鼠疫細菌學，東北人民政府衛生部出版，1951 年。
- [4] 鄒溶身：微生物學報，6: 171—178, 1957.

PRODUCTION OF ANTISERUM BY MEANS OF ALUM-CONCENTRATED PLAGUE PHAGE

Hsu Ling-hsun, Ma Hsu-chun and Fang Liang

(Department of Bacteriology, Peking Medical School, Peking)

It was found by the authors that 0.625% potassium alum is the optimum concentration for the precipitation of the plague phage. The concentrated phage was studied for its antigenicity, which was compared with the natural unconcentrated phage by both intravenous and subcutaneous routes of injection. It was clearly shown that the alum-concentrated phage was much more effective in production of antibody especially by the intravenous route. The neutralizing titre obtained was between 1:10,240—1:20,480.

Incidentally, the neutralizing test by means of the test tube method and by the plate method was compared, and in general, the latter showed 2—3 times higher titre than the former. In addition, the conditions for the optimum performance of neutralization test was also studied.