

# 伤寒、副伤寒菌的 $V_i$ 抗原及 O 抗原 复合物生成的电泳研究\*\*\*

謝彥博

(卫生部生物制品研究所生物化学室, 北京)

新从患者分离的伤寒菌株, 往往不被抗菌的 O 血清所凝集。Felix 及 Pitt<sup>[1]</sup> 証明这是由于存在着一种新的抗原成分。他們称之为  $V_i$  抗原。一般认为<sup>[2]</sup> O 抗原存在于伤寒菌的表面、 $V_i$  抗原又包裹在 O 抗原的外面, 因此, 妨碍了 O 抗体与 O 抗原的接触, 因而产生所謂“O 不凝集性”。当用加热、加酸或加酒精等处理时,  $V_i$  抗原或从菌体表面溶解下来, 或被破坏<sup>[3]</sup>。亦有人<sup>[4]</sup>认为  $V_i$  抗原、O 抗原同时存在于細菌表面, 其間不一定是  $V_i$  抗原包裹了 O 抗原;  $V_i$  抗原对 O 抗原之干扰是空間位阻作用, 或是由于  $V_i$  抗原具有某种对于細菌有非特异性稳定作用的特殊物理化学性质。可見, 关于 O 抗原与  $V_i$  抗原在伤寒菌表面的关系, 尚未有定論。

我們用电泳方法証明提純的伤寒菌  $V_i$  抗原和 O 抗原能够生成稳定的复合物, 并对此等复合物的生成条件、稳定性及解离条件等进行研究。其結果可对伤寒菌表面抗原結構的研究提供一些綫索。

## 一、材料及方法

**抗原** 先从伤寒菌 (Ty<sub>2</sub> 株) 用經修改过的 Topley 及 Raistrick<sup>[5]</sup> 胰蛋白酶消化法制备复合的 O 及  $V_i$  抗原粗制品<sup>1)</sup>, 再按 Gunda<sup>[6]</sup> 法 (不加亚硝酸处理) 分离 O 及  $V_i$  抗原, 反复沉淀 3 次以純化之。所得 O 抗原再在 23,500 g 离心 1 小时, 上清含核酸及小分子抗原, 傾弃之。沉淀加水溶解成胶体溶液, 是为純化的胰酶法 O 抗原 (简称 O 抗原)。沉淀反应检查: O 滴度 1:3125, 不含  $V_i$  抗原。經 0.02 N NaOH 处理后琼脂扩散沉淀試驗: 与 O 血清生成三条沉淀带。对小鼠 50% 死亡剂量 (LD<sub>50</sub>) 为 0.5 毫克左右。特异保护力: 使 50% 的小鼠活存的免疫剂量 (ED<sub>50</sub>) 在 10<sup>-3</sup> 毫克左右。它是一种脂多糖蛋白复合物, 含蛋白質 (Lowry 法<sup>[7]</sup>) 約 20%。所得  $V_i$  抗原之沉淀反应:  $V_i$  滴度 1:3125, O 滴度 1:5, LD<sub>50</sub> > 4 毫克, ED<sub>50</sub> 10<sup>-4</sup> 毫克左右。蛋白質含量約 1%。

此外, 还按 Westphal 等<sup>[8]</sup> 的冷酚及热酚法从伤寒及副伤寒菌制备 O 抗原, 亦用 23500 g 离心 1 小时純化之 (称冷酚或热酚 O 抗原)。LD<sub>50</sub> 0.3—0.5 毫克。按 Freeman<sup>[9]</sup> 的酸水解法制备 O 半抗原多糖。

**自由界面电泳 (简称电泳)** 用 Antweiler 微量电泳仪。样品用相应缓冲液透析 3—5 天。电泳时

\* 本文曾在北京生理学会 1963 年年会报告。

\*\* 本文的初步实验是 1960 年在伤寒純化抗原研究协作組内进行的。在工作过程中得到本所菌苗室陈正仁主任的关心和菌苗室伤寒組同志的协助。

本文 1963 年 5 月 30 日收到。

1) 由本所菌苗室伤寒組供給。

溫度  $14 \pm 0.1^\circ\text{C}$ 。其他條件見附圖說明。电泳時間一般 12 分鐘，其間攝影 4 次。在低倍顯微鏡下測量泳動距離。以時間對距離作圖求出斜率，用自制電橋式電導儀測定比電導，由此即可算出泳動速度（參見附錄）。一般只觀察上升腳的情況，個別情況下亦觀察下降腳。

**淀粉板电泳** 按 Kunkel 法<sup>[10]</sup>。條件見附圖說明。电泳後在每一厘米處切開，用 Lowry 法測定蛋白質，繪出电泳圖。

## 二、結 果

**(一)  $V_i$  抗原、O 抗原復合物之生成** 用離子強度 0.1 的 pH 6.9 磷酸鹽氯化鈉緩沖液作电泳時， $V_i$  抗原呈均一的一個峯（圖 1 B），泳速較快，為  $-24.4 \times 10^{-5}$  厘米<sup>2</sup>·秒<sup>-1</sup>。



圖 1  $V_i$  抗原、O 抗原復合物之生成及  $V_i$ 、O 比例的影響

pH 6.9,  $I/2$  0.1 磷酸鹽氯化鈉緩沖液。電流 1.5 毫安，電壓梯度 2.6 伏/厘米。电泳溫度  $14^\circ\text{C}$ ，除 A 泳動 18 分外，均泳動 12 分。除 F 為下降腳（樣品同 E）外，均為上升腳之照片。上升腳泳動從右往左，下降腳從左往右。由於泳動時間相同，可以直接比較。A 為 O 抗原，B 為  $V_i$  抗原，C—M 為不同  $V_i/O$  比例（ $V_i$  逐漸增加）之圖形（詳見表 1）。

伏<sup>-1</sup>; O 抗原亦呈一个峯, (图 1 A) 但稍有不对称, 泳速极慢, 为  $-1.0 \times 10^{-5}$ 。如将  $V_i$  抗原与 O 抗原以不同比例混合立即作电泳则可见  $V_i$  峯减少, O 峯消失, 出现了泳速中等的 1—3 个峯, 并且随着  $V_i$  抗原量的相对增加, 它们的泳速也逐渐增加 (图 1 C—M, 2 A, 表 1)。这是由于 O 抗原已和  $V_i$  抗原结合, 结合后获得了较多的负电荷之故。原来在电泳上呈一个峯的 O 抗原与  $V_i$  抗原结合后, 成为 1—3 个峯, 这可能因为 O 抗原本身仍是不均一的, 它们与  $V_i$  抗原结合的能力不同, 结合的  $V_i$  抗原量不同, 获得的负电荷量也不同, 生成了不同的复合物之故。也可能是由于均一的 O 抗原能按不同结合比例而与  $V_i$  结合成不同的复合物。现将这些复合物依泳速称为  $C_1$ 、 $C_2$ 、 $C_3$ 。在一定的  $V_i/O$  比值下, 它们是比较稳定的复合物, 因如将电泳时间延长一倍或将  $V_i$  抗原 O 抗原总浓度减少一半对其泳速及比例并无影响。这种复合物的生成是极其迅速的, 因将  $V_i$  抗原 O 抗原混合后在 37°C 保温 4 小时, 电泳结果与立即进行者无甚不同。上述现象是在上升脚观察的, 此时由于有自由  $V_i$  抗原的存在可以避免某些不稳定的复合物在电泳时平衡方向转变而趋于解离的情况。为了考察  $V_i$ 、O 复合物的稳定性, 也观察下降脚的图形, (图 1 F) 情况和上升脚相似。如按 Bernfeld<sup>[11]</sup> 的分类, 它们属于比较稳定的第 II 类的复合物。

至于  $V_i$  抗原, 一部分以自由的形式存在, 可从泳动速度的不变来判定, (图 2 A) 另一部分与 O 抗原结合成复合物, 因在电泳定量时自由的  $V_i$  抗原比加入的  $V_i$  抗原为少。(表 1) 曾试图计算出单位重量 O 抗原所结合的  $V_i$  抗原量, (表 1, 图 2 B) 但因电泳定量, 尤其是当  $C_1$  与  $V_i$  峯相近时, 误差较大, 只能得到粗略的估计。

表 1  $V_i$  抗原 O 抗原比值对于复合物生成的影响\*

照片号	O 抗原量 (干涉计 读数)**	$V_i$ 抗原量 (干涉计 读数)	$V_i/O$ 比 值 (干涉 计读数)	$-U_{14^\circ C} \times 10^6$ 厘米 <sup>2</sup> ·秒 <sup>-1</sup> ·伏 <sup>-1</sup>					自由 $V_i$ 抗原量 (干涉计 读数)	结合 $V_i$ 抗原量 (干涉计 读数)	结合 $V_i$ 抗原/O 抗 原 (干涉计 读数)
				$V_i$	$C_1$	$C_2$	$C_3$	O			
A	62.8							1.0			
B		27.7		24.4							
C	108.3	2.1	0.019	24.4	6.6		4.6	1.2	0.9		
D	102.6	4.3	0.042	24.4	9.5		5.4	4.4	—		
E***	91.2	8.5	0.093	24.4	14.6		8.5	7.6	0.9	0.010	
G	79.8	12.8	0.160	24.4	17.5	14.9	11.7	9.9	2.9	0.036	
H	68.4	17.1	0.250	24.4	20.2	16.8	13.4	12.0	5.1	0.075	
I	57.0	21.4	0.375	24.4	20.9	18.3	13.2	14.5	6.9	0.120	
J	45.6	25.6	0.561	24.6	21.9	20.0		18.2	7.4	0.162	
K	34.2	29.9	0.875	24.4	22.1			23.9	6.0	0.175	
L	22.8	34.2	1.50	24.6	22.9			26.7	7.5	0.329	
M	11.4	38.4	3.37	25.4	23.6			35.3	3.1	0.272	

\* 电泳条件: 离子强度 0.1, pH 6.9 磷酸盐氯化钠缓冲液, 电泳池温度  $14 \pm 0.1^\circ C$ , 电流 1.5 毫安/0.05 厘米<sup>2</sup>, 电压梯度 2.6 伏/厘米。泳动时间 720 秒。所有数字均为上升脚的测定。

\*\* 该仪器上 Jamin 干涉计之读数。1% 的 O 抗原溶液的读数为 114.0。1% 的  $V_i$  抗原溶液的读数为 42.7。

\*\*\* 图 1 F 为下降脚照片, 实验条件同 F。

为了进一步证实  $V_i$ 、O 复合物的生成, 排除界面电泳时可能发生的界面异常现象, 曾应用淀粉板区带电泳法。单独的 O 抗原在原放样品处呈不对称的一个峯, 加入  $V_i$  抗原后则向正极泳动, 并分为三个峯。(图 3)

**(二) pH 对 Vi、O 复合物生成的影响** 在 pH 2.0—9.6 范围内，Vi 及 O 抗原均为一个峯，其泳速在 pH 2—5 間逐漸增加，至 6 以上則維持恆定不变。(图 4) 这与一般报告酸性粘多糖之电泳性质相符。它们的电荷几乎全由于酸性基团解离之故，在 pH 6 以上则已全部解离，电荷維持恆定不变。

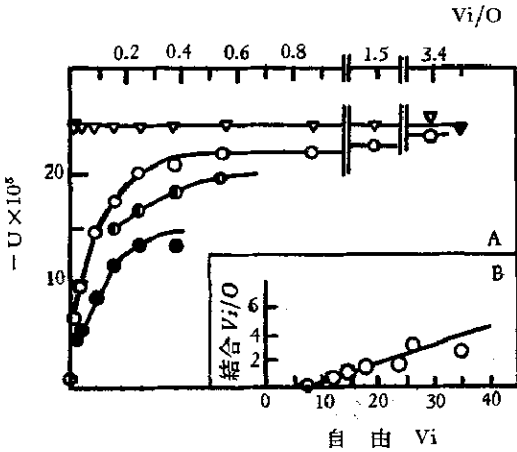


图 2A Vi 抗原 O 抗原比例对于复合物之泳速之影响 (参考表 1 及图 1)

电泳条件同图 1。▼ Vi 抗原单独电泳，▽ Vi 抗原与 O 抗原混合后之自由 Vi 抗原，○ 复合物 C<sub>1</sub>，● C<sub>2</sub>，● C<sub>3</sub>。

图 2B Vi 抗原 O 抗原的结合曲线 单位为干涉计读数。

在 pH 2.0—9.6 内，复合物生成的情况无大变化。(图 4) C<sub>1</sub>、C<sub>3</sub> 的 pH-泳速曲线与 Vi 基本相似，只 C<sub>3</sub> 在 pH 9.5 处稍有上升现象。可见 Vi、O 复合物是比较稳定的，在 pH 2.0—9.6 范围内不受 pH 改变的影响。

**(三) 缓冲液离子强度及种类的影响** 用离子强度 (Γ/2) 为 0.05、0.1、0.2 及 0.3 的磷酸盐氯化钠缓冲液作电泳时的 Γ/2-泳速曲线见图 5。随着 Γ/2 的增加，Vi、C<sub>1</sub> 及 C<sub>3</sub> 的泳速逐渐下降，但复合物不发生解离。

用 0.05 M，pH 9.3 的硼砂缓冲液作电泳时，Vi 之泳速无大变化，O 之泳速增加至  $9.5 \times 10^{-5}$ ，可能因硼酸离子与 O 抗原中的多糖生成复合物之故。但加入 Vi 后，此种复合物即为 Vi、O 复合物所代替。(图 4)

用辛酸钠磷酸盐缓冲液时，结果与单用磷酸盐无甚不同。可见 O 抗原中之蛋白质部分不能与辛酸离子生成复合物。

**(四) Vi 抗原与各种 O 抗原生成复合物的情况** Vi 抗原与伤寒、副伤寒甲之冷酚、热酚 O 抗原和副伤寒乙之热酚 O 抗原，均可生成复合物，但生成复合物的数目及泳速则各有不同。此反映了这些抗原制品在成分及性质上的差异性。为了探求 Vi 抗原是与 O 抗原脂多糖蛋白复合物中那一种成分结合，曾将伤寒、副伤寒甲冷酚 O 抗原用热酚法再处理两遍，产品的蛋白质含量低至 0.2% 及 0.6% (Lowry 法)，氮 1.05% 及 1.00% (Nessler 法)，小鼠 LD<sub>50</sub> 小于 0.25 毫克。它们与 Vi 结合的能力并不减少。故初步看来，Vi 并不是与其中的蛋白质部分结合。曾按 Freeman 法制出 O 半抗原多糖，其蛋白质含量 0.2%，

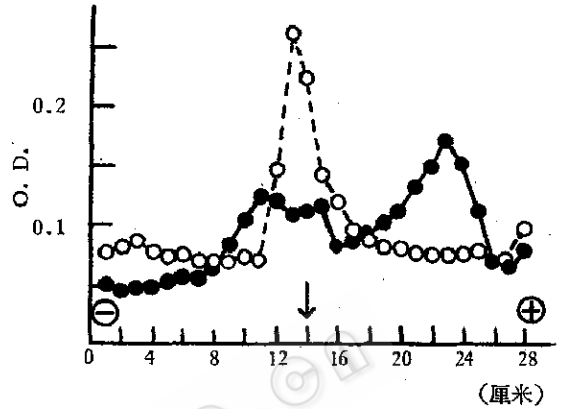


图 3 Vi 抗原 O 抗原复合物之生成之淀粉板型电泳试验

馬鈴薯淀粉板 28×4×1 厘米，pH 7.6，Γ/2 0.1 磷酸盐氯化钠缓冲液。190—205 伏，16 毫安。4—6°C，6 小时。……○……○……为 O 抗原 11.2 毫克，—●—●—为 O 抗原 11.2 毫克加 Vi 抗原 20 毫克。Lowry 法蛋白显色。Vi 抗原不显色。

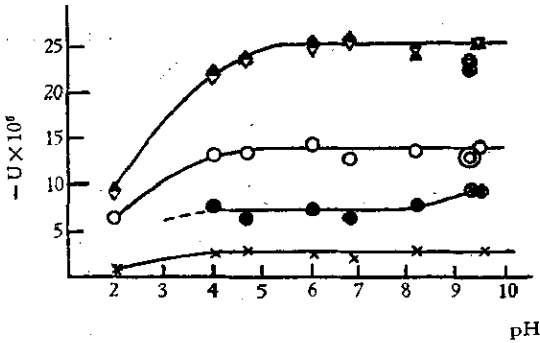


图4 pH对Vi抗原-O抗原复合物泳动速度之影响

pH 2.0为甘氨酸盐、pH 4.0及4.7为醋酸盐、pH 6.1及6.9为磷酸盐、pH 8.3为二乙基巴比土酸盐、pH 9.6为甘氨酸盐缓冲液、 $\Gamma/2$  0.1。▲为Vi抗原单独作电泳、▽为Vi抗原与O抗原混合后(Vi抗原量6.0, O抗原量63.8, 均干涉计读数)之自由Vi抗原, ○为C<sub>1</sub>, ●为C<sub>8</sub>, ×为O抗原单独作电泳。⊙、⊗、⊘各为用pH 9.3, 0.05M 硼液缓冲液时的Vi抗原, 自由Vi抗原、Vi及O复合物及O抗原的泳速。

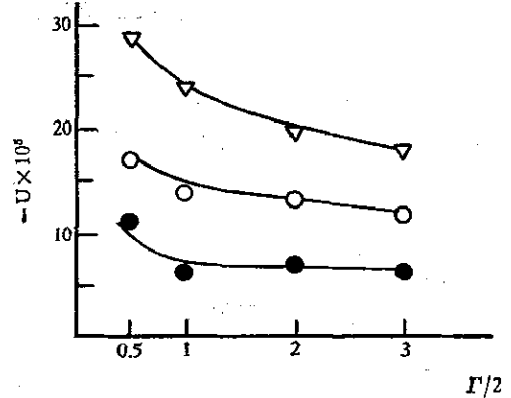


图5  $\Gamma/2$ 对Vi抗原-O抗原复合物泳动速度之影响

O抗原91.2加Vi抗原8.5(均干涉计读数)。 $\Gamma/2$  0.05时, pH 6.9, 1.2毫安, 泳动9分。 $\Gamma/2$ 为0.1时, pH 7.0, 1.5毫安, 12分。 $\Gamma/2$ 为0.2时, pH 7.0, 2.0毫安, 16分。 $\Gamma/2$ 为0.3时, pH 7.0, 2.0毫安, 18分。以上均磷酸盐缓冲液。▽、○、●的说明见图4。

氮0.20—0.22%, 小鼠LD<sub>50</sub>大于8毫克, 在电泳中呈较扁平的一个峰泳速 $-2.5 \times 10^{-5}$ 。它不能与Vi抗原生成复合物。这可能因制备过程中酸水解破坏了O抗原中能Vi结合的結構, 或因除去了类脂成分之故。

### (五) Vi、O复合物的降解

(1) 稀醋酸加热降解: O抗原加醋酸至0.5N, 在沸水浴回流加热, 约半小时后即有多量沉淀出现, 同时上清变为清亮失去乳光。根据Freeman<sup>[9]</sup>及Morgan<sup>[12]</sup>等的研究, 稀醋酸水解时出现的沉淀主要为酸不溶性蛋白质及类脂, 上清主要为半抗原多糖。共加热2小时后在上清中加入乙醇制出半抗原多糖, 其电泳如图6G, 它相同于上述半抗原多糖, 不能与Vi生成复合物(图6H)。Vi抗原0.5N醋酸沸水浴加热4小时后仍无大变化, (图6I) 不失去与O抗原(冷酚法)结合之能力。(图6J) 如将Vi与O抗原混合后再在0.5N醋酸中加热2小时, 溶液无明显变化, 不出现沉淀, 但在电泳中则见有明显的变化, (图6F) Vi峰大为增加(干涉计读数48.0), 比原加入的Vi(干涉计读数10.7)量为多, 各复合物峰消失, 出现与半抗原多糖相似的一个峰。因此, 可以认为在有Vi抗原存在下稀醋酸加热亦可以使O抗原脂多糖蛋白复合物降解成为脂蛋白及多糖部分, 但该脂蛋白已与Vi抗原结合成为复合物, 因而不沉淀, 而在没有Vi抗原的场合, 脂蛋白即沉淀而出。

(2) 稀碱降解: 0.02N NaOH 37°C保温18小时即可将Vi、O复合物解离(图6A)。单独处理O抗原在电泳中无明显变化, (图6B) 仍能与Vi抗原结合, (图6C) 但结合后复合物的电泳图形扁平, 可见已有一定程度的降解。单独处理Vi抗原(图6D)能显著地降低其与O抗原结合的能力。(图6E) 0.1N NaOH 37°C保温2小时的结果相似。

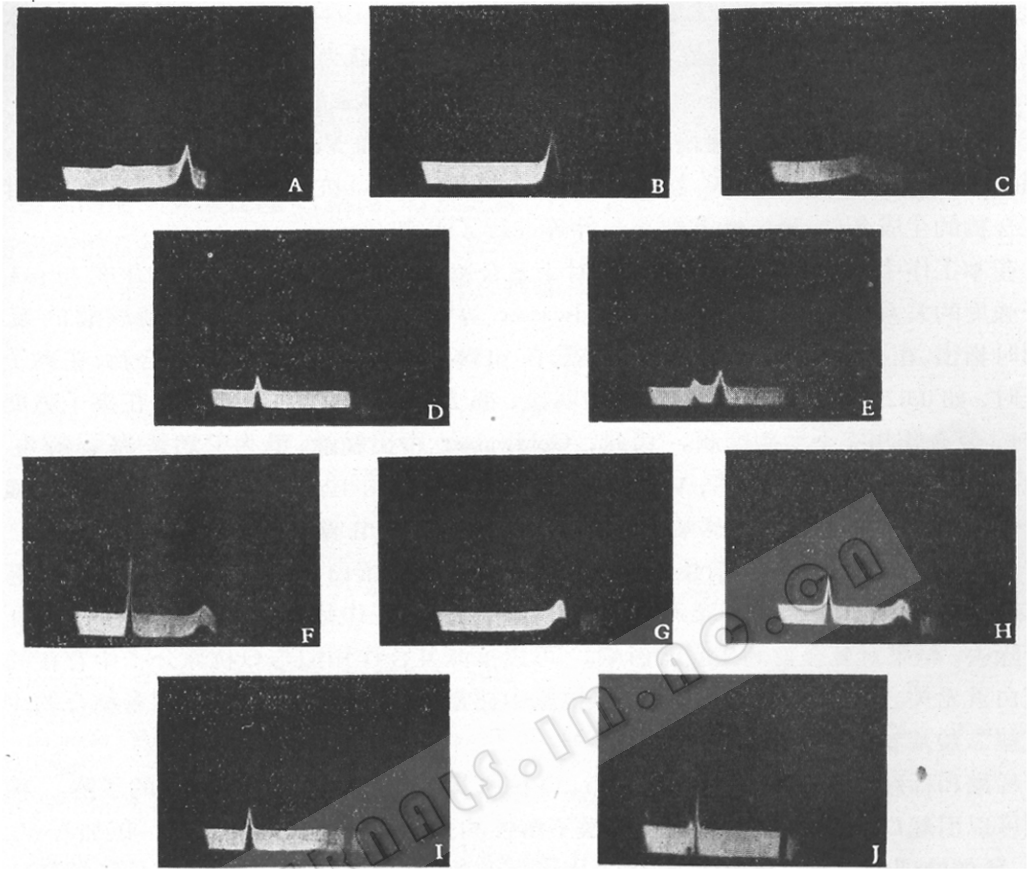


图 6 稀碱及稀醋酸处理对于 O 抗原、Vi 抗原和 Vi、O 复合物的影响

A. 0.02 N NaOH 37°C 18 小时处理 Vi、O 复合物。B. O 抗原依上法处理。C. 同 B, 加入 Vi 抗原。D. Vi 抗原依上法处理。E. 同 D, 加入 O 抗原。F. Vi 抗原加 O 抗原, 0.5 N HAc 100°C 2 小时。G. O 抗原, 0.5 N HAc 100°C 2 小时, 除去沉淀, 上清加乙醇沉淀得半抗原多糖。H. 同 G, 加入 Vi 抗原。I. Vi 抗原, 0.5 N HAc 100°C 4 小时。J. 同 I, 加入冷酚 O 抗原。电泳条件同图 1。

### 三、討 論

生物体的高分子物质, 如蛋白质、类脂、粘多糖等常彼此结合或与其他小分子物质结合成为稳定程度不同的复合物。这种复合物的生成对于它们的生物活性的发挥有着重要意义。例如 Longsworth 等<sup>[13]</sup>用电泳方法证明卵清蛋白与酵母核酸生成复合物, Goldwasser 等<sup>[14]</sup>证明血清清蛋白与胸腺核酸生成复合物。酶作用时与基质结合生成的中间产物, 可以通过电泳方法来证实<sup>[15]</sup>。许多合成洗涤剂<sup>[16,17]</sup>和染料<sup>[18]</sup>对蛋白质的作用亦可用生成复合物来解释。一些药物在体内常与血浆蛋白质结合, 因而对其分布、储存、作用期限等都有影响<sup>[19]</sup>。多种多聚阴离子如肝素<sup>[20]</sup>、硫酸右旋糖酐<sup>[21]</sup>亦能与蛋白质结合。在抗原抗体沉淀反应方面, 当抗原量超过当量时即生成可溶性的抗原抗体复合物, 其存在曾被 Marrack 等<sup>[22]</sup>、Singer 等<sup>[23]</sup>用电泳法及超离心法证实。他们<sup>[21,24,25]</sup>并根据被结合的抗原量来计算抗体的结合价和沉淀反应的某些热力学常数。在伤寒抗原方面, 1939 年 Combiesco 及 Soru<sup>[26]</sup>曾初步报告当有 Vi 抗原存在时, O 抗原的泳动加速而与 Vi 抗原相等。但

因他們所用电泳仪比較原始,未能观察到許多泳动細節。1944年 Linton 等<sup>[27]</sup>曾用电泳方法观察濃縮的伤寒菌培养液,发现有  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  三个峯,并认为  $V_i$  抗原存在于  $\beta$ -峯。由于当时有关用电泳方法研究复合物的理論尚未成熟,他們并未能認識到复合物的生成。但最近 Jarvis<sup>[28]</sup> 等却报告可用連續紙电泳法将伤寒抗原分为  $V_i$  及  $O$  两部分。在本文中,我們用电泳法証明了伤寒菌的  $V_i$  抗原和伤寒、副伤寒菌的  $O$  抗原可以生成复合物,并对此等复合物的生成条件、稳定性及解离条件等进行了研究。

在本工作中观察了 pH 及离子强度对于复合物的影响。已知复合物的生成与 pH 及离子强度的关系通常比較密切。如 Goldwasser 等<sup>[14]</sup> 研究血清清蛋白与胸腺核酸的复合作用时指出,在 pH 5.5 时有复合物的生成,在 pH 6.4 及 7.6 时則不生成复合物;在离子强度低时,如 0.02—0.05,复合物的生成較明显,离子强度高时有解离現象。在离子强度达 0.2 时,复合作用完全受到抑制。由此,Goldwasser 得出結論,认为它們是靠靜电吸引力結合的。我們的实验說明, $V_i$  抗原与  $O$  抗原复合物的生成在 pH 2.0—9.6、离子强度 0.05—0.3 的范围内沒有受到影响,因此,可能不是借着靜电吸引力結合的。

由于  $O$  抗原是結構尚未清楚的成分复杂的类脂多糖蛋白复合物,目前尚不可能对  $V_i$ 、 $O$  抗原复合作用的机构作深入的了解。我們初步的工作是用热酚法將其中的蛋白質尽量除去,結果对复合物的生成无影响。可以推測复合作用似与  $O$  抗原分子中存在的多量蛋白質无关。当然,这并不能排除  $O$  抗原中經常存在的与所謂类脂 A 紧密結合的少量的某些二羧基氨基酸和其他氨基酸的参与。

稀酸和稀碱的降解实验有助于对  $V_i$ 、 $O$  抗原复合物和  $V_i$ 、 $O$  抗原本身的了解。稀酸处理可以引起  $O$  抗原降解,降解时出現酸不溶性的蛋白質和类脂的沉淀物。在加入  $V_i$  抗原后,稀酸处理仍可使  $O$  抗原降解,但不出現沉淀物。此时如用电泳观察可見降解产物类脂蛋白已和  $V_i$  抗原結合。稀碱对  $V_i$  及  $O$  抗原均有一定的破坏作用。在  $V_i$  抗原方面,其表现为与  $O$  抗原結合的能力显著地降低。在  $O$  抗原方面,与  $V_i$  抗原結合的能力似无大变化,但其本身已有降解作用,这在  $O$  抗原单独电泳时是不能察觉的,但加入  $V_i$  抗原后即可看出。

以上虽已証明  $V_i$ 、 $O$  抗原可生成复合物,但这只是用电泳方法和提純的抗原在溶液中得出的結果。至于在菌体表面上原来的状态如何,尚不能直接回答,因为菌表面的鑲嵌結構远比我們的实验条件复杂。虽然如此,仍可以推測,发现这种复合物的生成和它們的結合方式在了解伤寒菌体表面抗原构造上将起重要的作用。

$O$  抗原及  $V_i$  抗原在伤寒預防免疫中的意义及其相互关系仍多有爭論<sup>[29-31]</sup>,  $V_i$  抗原与  $O$  抗原生成复合物的証实对于闡明这一問題,也将有一定意义。

#### 四、摘 要

1.  $V_i$  抗原、 $O$  抗原在电泳时各呈均一的峯,前者泳动速度較快,  $-24.4 \times 10^{-5}$  厘米<sup>2</sup> · 秒<sup>-1</sup> · 伏<sup>-1</sup>, 后者极慢,  $-1.0 \times 10^{-5}$ 。但將  $V_i$  抗原与  $O$  抗原以不同比例混合后立即作电泳則可見  $V_i$  峯減少,  $O$  峯消失,出現了泳速較快的 1—3 个峯,并且随着  $V_i$  抗原量的相对增加,它們的泳速也逐漸增加。这是由于生成了不同的复合物之故。

2. 在 pH 2.0—9.6, 离子强度 0.05—0.3 的范围内,生成的复合物是稳定的,因此,可

能不是依靠靜电吸引力結合。

3. Vi 抗原与伤寒、副伤寒甲乙的冷酚或热酚法制备的 O 抗原均可生成复合物。冷酚法 O 抗原再經热酚法除蛋白質二次后可得蛋白含量 (Lowry 法) 低至 0.2—0.6% 的脂多糖。它仍能与 Vi 抗原生成复合物。

4. 稀醋酸及稀碱处理 Vi 抗原、O 抗原及 Vi、O 复合物可引起各种降解現象。这种变化与这些抗原及其复合物的結構及成分有关。

5. 对 Vi 抗原 O 抗原复合物生成在微生物学、免疫学上的意义加以討論。

### 参 考 文 献

- [1] Felix, A. and Pitt, R. M.: *Lancet*, 227:186, 1934.
- [2] Almon, L.: *Bact. Rev.*, 7:43, 1943.
- [3] Kauffmann, F.: *Enterobacteriaceae*, 2nd ed., 1954.
- [4] Landy, M. and Ceppellini, R.: *Nature*, 176:1266, 1955.
- [5] Topley, W. W. C., Raistrick, H., Wilson, J., Stacey, M., Challinor, S. W. and Clark, R. O. J.: *Lancet*, 232:252, 1937.
- [6] Gunda, L., Joó, I., Richter, P. and Váli, A.: *Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung.*, 4:263, 1957.
- [7] Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J.: *J. Biol. Chem.*, 193:265, 1951.
- [8] Westphal, O., Lüderitz, O. u. Bister, F.: *Z. Naturforschg.*, 7b:148, 1952.
- [9] Freeman, G. G.: *Biochem. J.*, 36:340, 1942.
- [10] Kunkel, H. G. and Slater, R. J.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 80:42, 1952.
- [11] Bernfeld, P., Nisselbaum, J. S., Berkeley, B. J. and Hanson, R. W.: *J. Biol. Chem.*, 235: 2852, 1960.
- [12] Morgan, W. T. J. and Partridge, S. M.: *Brit. J. Exp. Path.*, 23:151, 1942.
- [13] Longworth, L. G. and MacInnes, D. A.: *J. Gen. Physiol.*, 25:507, 1942.
- [14] Goldwasser, E. and Putnam, F. W.: *J. Phys. and Colloid Chem.*, 54:79, 1950.
- [15] Cann, J. R. and Klapper, J. A. Jr.: *J. Biol. Chem.*, 236:2446, 1961.
- [16] Putnam, F. W. and Neurath, H.: *J. Biol. Chem.*, 159:195, 1945.
- [17] Aoki, K.: *J. Amer. Chem. Soc.*, 80:4904, 1958.
- [18] Smith, R. F. and Briggs, D. R.: *J. Phys. and Colloid Chem.*, 54:33, 1950.
- [19] Klotz, I. M.: *Biological significance of protein interactions. The Proteins. IB, Acad. Press*, 1953, p. 804—805.
- [20] Chargaff, E., Ziff, M. and Moore, D. H.: *J. Biol. Chem.*, 139:383, 1941.
- [21] Thompson, T. E. and McKernan, W. M.: *Biochem. J.*, 81:12, 1961.
- [22] Marrack, J. R., Hoch, H. and Johns, R. G. S.: *Brit. J. Exp. Path.*, 32:212, 1951.
- [23] Singer, S. J. and Campbell, D. H.: *J. Amer. Chem. Soc.*, 77:3504, 1955.
- [24] Idem.: *ibid.*, 75:5577, 1953.
- [25] Idem.: *ibid.*, 77:3499, 1955.
- [26] Combesco, C. et Soru, E.: *C. R. de la Soc. de Biol.*, 132:172, 1939.
- [27] Linton, R. W., Smith, L. D. and Krejci, L. E.: *Arch. Biochem.*, 4:195, 1944.
- [28] Jarvis, F. G., Mesenko, M. T., and Kyle, J. E.: *J. Bact.*, 80:677, 1960.
- [29] Landy, M.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 80:55, 1952.
- [30] Cvjetanović, B. B.: *Amer. J. Pub. Health*, 47:578, 1957.
- [31] Landy, M., Webster, M. E. and Sagin, J. F.: *J. Imm.*, 73:23, 1954.



# ELECTROPHORETIC STUDY OF THE COMPLEXES FORMATION BETWEEN Vi ANTIGEN AND O ANTIGENS OF *SALM. TYPHOSA* AND *SALM. PARATYPHI* A AND B

HSIEH YEN-PO

(Laboratory of Biochemistry, National Vaccine and Serum Institute, Peking)

Both Vi antigen and O antigens behaved as one homogeneous peak in free boundary electrophoresis. Their electrophoretic mobilities were  $-24.4 \times 10^{-5}$  and  $-1.0 \times 10^{-5}$   $\text{cm}^2 \times \text{sec}^{-1} \times \text{volt}^{-1}$ , respectively. When a mixture of Vi antigen and O antigen was examined by electrophoresis immediately or after incubation at  $37^\circ\text{C}$  for 4 hours, the Vi peak decreased and the O peak disappeared. However, 1—3 peaks with intermediate mobilities appeared. The number of the intermediate peaks varied according to the Vi antigen/O antigen ratio. Their mobilities increased according to the increase of Vi/O ratio also. This has been interpreted as indicating the formation of complexes between Vi antigen and O antigen.

The Vi-O complexes were stable within the pH range 2.0—9.6 and ionic strength range 0.05—0.3. This indicated that the interacting forces are not electrostatic. The pH-mobility curves of these complexes were similar to that of chondromucoprotein.

The complexes formation also occurred between Vi antigen and O antigens, prepared by Westphal's hot or cold phenol-water extraction methods from *Salm. typhosa* and *paratyphi* A and B. A lipopolysaccharide fraction containing 0.2—0.6% protein which was prepared by subjecting cold phenol-water extracted O antigens to two further treatments with hot phenol-water, still formed complex with the Vi antigen. This excluded the participation of the protein moiety of O antigen in the interaction.

When the Vi antigen, O antigens, and Vi-O complexes were subjected to dilute acetic and dilute alkali treatment, there occurred various kinds and degrees of degradation, depending on the chemical structure and composition of these antigens and complexes.

The microbiological and immunological significance of Vi-O complexes formation has been discussed.

## 附 录

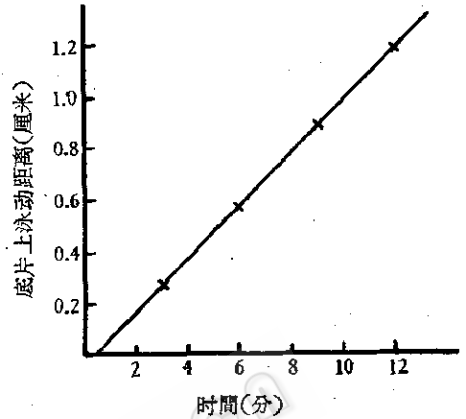
### 用 Antweiler 微量电泳仪测定泳动速度的方法

自 Tiselius 1937 年<sup>[1]</sup>发表了他对于电泳方法的改进以后,一般都在  $0-4^\circ\text{C}$  测定电泳速度。由于这种电泳仪价格昂贵,样品用量大,电泳时间较长,故近年又有所谓微量电泳仪问世,如 Kern<sup>[2]</sup>、Antweiler<sup>[3]</sup> 等。但它们在结构上有一些缺陷,尤其是无低温恒温装置,因此,尚未见用以测定泳动速度。

我們在傷寒菌 Vi、O 抗原複合物的研究中，曾試用 Antweiler 微量电泳儀測定泳動速度。結果重復性尚可。適用於样品量少、試驗次數多和研究泳動速度相對變化的場合。

使用 Boskamp Geräte-Bau 出品的 Antweiler 电泳儀，在室溫 15—20°C 時冷卻套循環通入 12.5 ± 0.1°C 的恆溫水。用 pH 6.9 的離子強度 0.1 的磷酸鹽氯化鈉緩衝液。電流 1.5 毫安。電壓 36—40 伏。在 U 管之兩端測電壓梯度為 2.6 伏/厘米。泳動時間 12 分。电泳結束時以半導體溫度計測电泳池內部溫度為 14°C。电泳時每隔 3 分攝影一次。底片在低倍顯微鏡下測量高峯之泳動距離。因該儀器不能觀察原始界面，故測量時每次均以膠合面之上沿為基準。以時間對距離作圖得一直線如附圖 1。從直線之斜率即可得到單位時間之泳動距離（底片上的）。光學系統的放大倍數為 1.8，是用有 1 毫米準確刻度的血球計數板放在电泳池的位置上，經過光學系統投影在底片上來測出的。比電導是用自制電橋式電導儀測定。

斜率 = 1.02 厘米/10 分



附圖 1 Vi 抗原之泳動速度的測定

代入公式  $U = \frac{d}{t \cdot M} \times \frac{KA}{I}$  即可算出泳動速度。其中  $U$  為泳速 (厘米<sup>2</sup>·秒<sup>-1</sup>·伏<sup>-1</sup>)、 $d$  為底片上泳動距離 (厘米)、 $M$  為放大倍數、 $K$  為比電導 (歐姆<sup>-1</sup>)、 $A$  為电泳池截面積 (0.05 厘米<sup>2</sup>)、 $I$  為電流 (安培)。

如要將 14°C 的泳速折算為 0°C 的泳速，可乘以粘滯校正因素  $\left( \frac{\text{緩衝液在 } 14^\circ\text{C 時之粘滯}}{\text{緩衝液在 } 0^\circ\text{C 時之粘滯}} \right)^{[4,5]}$ 。

現將 0.5% Vi 抗原泳動速度測定結果列於表 1。

表 1 用 Antweiler 微量电泳儀測定 Vi 抗原的泳動速度(上升脚)

編號	電流 (毫安)	$d$ (厘米)/10 分	$-U \times 10^5$ (14°C)	$-U \times 10^5$ (0°C)
1	1.2	0.82	25.66	16.8
2	1.5	1.02	25.53	16.7
3	1.5	1.04	26.02	17.0
4	1.5	1.04	26.02	17.0
5	1.5	1.02	25.52	16.7
6	1.5	1.02	25.52	16.7
7	1.5	1.03	25.80	16.9
8	1.5	1.00	25.00	16.3
9	1.5	1.01	25.30	16.5

參 考 文 獻

[1] Tiselius, A.: *Trans. Faraday Soc.*, 33:524, 1937.  
 [2] Lotmar, W.: *Rev. Sci. Inst.*, 22:886, 1951.  
 [3] Antweiler, H. J.: *Kolloid-Z.* 115:130, 1949.  
 [4] Tiselius, A.: *Biochem. J.* 31:1464, 1937.  
 [5] Johnson, P. and Shooter, E. M.: *J. Colloid Sci.*, 3:539, 1948.