

大肠杆菌内毒素的制备及生物检定*

余庆 曹鹿笙 方之扬

近几年国内报导了内毒素研究方面的进展^[1-4],但是关于内毒素的化学成分与免疫、毒性等作用之间的关系以及解毒、临床诊断、治疗等方面问题,截至目前为止尚未获得充分的了解和统一的认识。而这些问题的解决是具有一定的理论与实际意义。作者鉴于目前国内实验研究的需要,特根据 Westphal^[5] 及 Tauber^[6,7] 等方法略加简化,以提取各种细菌的内毒素。现将大肠杆菌内毒素的制备方法及生物检定结果报告于下,以供参考。

实验方法和结果

1. 内毒素的制备

增殖培养基含下列成分 牛肉膏 1%,胰蛋白胨(tryptone) 1%,酵母浸膏 0.3%,氯化钠 0.5%,琼脂 1.5%,pH 7.3—7.5。将 1 株大肠杆菌(菌号 CS01,系由 1 名婴儿败血症患者血液培养分离而得)接种于普通营养肉汤,于 37℃ 孵育 24 小时,然后转种于增殖培养基上,在 37℃ 孵育 24 小时后,刮取菌苔,加双倍容积的灭菌生理盐水制成悬液菌悬液。离心沉淀(3000 转/分钟沉 30 分钟)洗涤 3 次,最后用双倍容积的丙酮沉淀瓶洗涤 1 次,并将压积细胞盛入蒸发皿,放至盛有硅胶的干燥器内,置入 38—39℃ 烤箱,约经 6—7 小时即干燥。每 60—80 瓶克氏瓶培养(每瓶 120 毫升)增殖获得的菌苔可制成 10 克干燥菌粉。

从干燥菌细胞提取内毒素的方法,主要参照 Westphal^[5] 及 Tauber 等^[6,7] 的报告,并根据我们的具体条件略加以简化。于 10 克菌粉内添加蒸馏水 160 毫升后搅拌均匀,并加入 75% 石炭酸溶液 265 毫升,充分震荡约 15 分钟后,放至 68℃ 水浴内加温 30 分钟。加温后放入冰箱(4℃)静置 20 分钟后取出。以 3000 转/分钟离心沉淀 10 分钟,沉毕即形成 3 层液层:上层为乳光色的液层,中层为白色的半固体层,下层为石炭酸层及少量不溶解的沉淀物。用虹吸管吸出上层水液后,再于下余 2 层内加入 50 毫升蒸馏水,充分搅匀后以同样速度沉淀 10 分钟。沉毕吸出上层水液与前述水液合并。上层水液先以 3000 转/分钟速度离心沉淀 30 分钟。沉毕弃去微量沉淀物,将上清液置入透析袋内,用流动自来水透析 48 小时,再改用蒸馏水透析 24 小时。此种透析物内含有内毒素及核糖核酸,称之为“粗制内毒素”。于每 100 毫升粗制内毒素中加入氯化钠 200 毫克及双倍量的丙酮。于丙酮加入后,内毒素与核酸即一并沉下,用离心沉淀法取出白色絮状沉淀物,再以少量丙酮洗涤之,最后以前述方法干燥。每 10 克干燥菌粉可提出 925 毫克粗制内毒素(占 9.25% 干燥菌细胞重量)。此种干燥粗制内毒素较易溶解于水内。

为了提高内毒素的纯度,并根据本实验室具体条件采用加热法及高速离心沉淀法除去其中蛋白质及核酸成分。即取干燥粗制内毒素,溶于蒸馏水内,配成 0.5% 浓度,让其完全溶解。以后于沸水浴内加热 5 分钟,冷却后以 3000 转/分钟速度离心沉淀 5 分钟,取出上清液(弃去沉淀),用 Christ K₃ III 型

* 参加技术操作的有郭玉贡。

本文为中国微生物学会 1963 年学术年会转稿。

冷冻高速沉淀器分离此上清液内的内毒素成分，即以 20,000 转/分钟速度离心沉淀 1 小时。沉毕分别取出上清液及凝胶样沉淀物（内含精制内毒素）。于此高速离心沉淀后的上清液内加入双倍容量丙酮，俟其沉淀后再取其沉淀物（即上清液提取物）。凝胶样沉淀物亦以少量丙酮洗涤之。并分别用前述方法将此 2 种沉淀物干燥。经此处理后可获得 4.1% 的干燥精制内毒素及 3.2% 的上清液提取物。此种精制内毒素不能完全溶解于蒸馏水或生理盐水中，需在 0.05 N 氢氧化钠溶液内方能溶解，然后再以 0.2 N 醋酸中和至 pH 7.2。

2. 化学分析

大肠杆菌粗制内毒素及精制内毒素的产量与元素分析结果如表 1。根据分光光度计的光谱分析证明，粗制内毒素的光密度波长 260 毫微米时光密度最大（图 1）。由此说明其中含有较多的核糖核酸（约占 50% 左右），故粗制内毒素含有较大量的氮和磷等。粗制内毒素经过加热及高速离心沉淀后，氮及磷等含量均有所减低，光密度测定结果不再见波峰。（见图 1）由此证明其中核糖核酸含量已大为减少。根据此分析可见本研究采用的简化方法亦能提高内毒素的纯度。

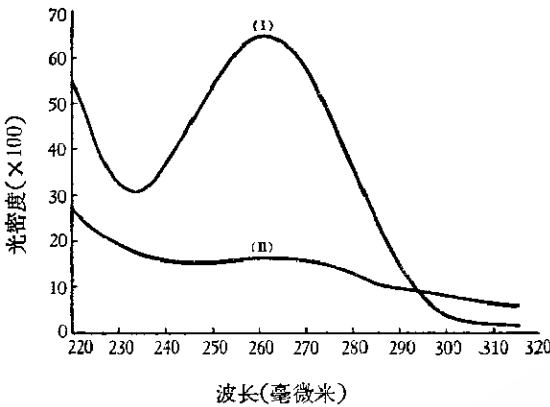


图 1 大肠杆菌内毒素的紫外线吸收光谱
(采用 Beckman Du 型分光光度计测定，均 0.01% 水溶液，1 厘米吸收池)
(I)粗制内毒素的吸收光谱；(II)精制内毒素的吸收光谱。

表 1 大肠杆菌内毒素的含量及氮、磷元素的分析结果

制 备 物	占干燥细胞的重量 (%)	氮、磷 含 量 (%)	
		氮	磷
粗制内毒素	9.25	6.56	6.52
精制内毒素	4.10	3.01	2.60

3. 生物检定

1) SPD₅₀ (Shwartzman 反应半数皮肤预备剂量)的测定 选用本校动物室饲养的雄性家兔 (2.5—3 公斤) 20 只，每 5 只 1 组。将各种制备物稀释成 6 个剂量，即每 0.2 毫升含有 10、5、2.5、1.25、0.62、0.3 微克，分别注入同一家兔的背部皮内(毛于事前退去)，并在其余 4 只家兔作同样注射。注射后间隔 20—24 小时，于全部实验动物静脉注射大肠杆菌精制内毒素 10 微克/公斤体重。6—12 小时内于局部出现出血性瘀斑，呈紫黑色，其直径约在 6—30 毫米之间，即为阳性结果。阳性结果以 12—24 小时最明显，严重者可出现坏死或溃疡，48 小时后逐渐消退。若皮内注射部位无出血性瘀斑，或反应区域小于 5 毫米即算阴性结果。各种制备物的 SPD₅₀ 均按 Kärber 的方法计算^[8]。实验结果列入表 2，其结果证明菌细胞及上清液提取物的 SPD₅₀ 均 >10 微克；上清液提取物的最大剂量可使个别动物产生阳性反应，说明其中尚残留少量内毒素；粗制内毒素的 SPD₅₀ 为 3.25 微克 (95% 的可信限是 ±1.58)；精制内毒素为 1.4 微克 (95% 的可信限是 ±0.74)；二者相差两倍以上，说明后者得到了进一步浓缩，其毒性也得到相应的增强。

2) LD₅₀ 的测定 小鼠分为 3 组，分别于每组动物的腹腔注射不同的制备物 0.5 毫升。注射后连续观察 4 日，记取死亡数，按 Kärber 的方法计算 LD₅₀^[8]。结果见表 3。

3) 热原试验 选用 2—2½ 公斤体重的家兔(雌雄不分)。注射内毒素前 2 小时，用肛表量取正常体温 2 次，两小时内其体温的波动不超过 0.2℃ 者方可采用。按每公斤体重注射精制内毒素 20、10、2.5、1.0、0.1、0.025、0.001 微克(含于 1 毫升内)，对照组仅注射等容量无热原生理盐水。每 1 剂量注射 3 只家兔 (为 1 组)。注射后每小时量取体温 1 次，求出每组动物体温升高的最高平均值，并与注射前的体温比较，结果如图 3、4，证明每公斤体重注射 5—20 微克时，体温升高的平均值可达 1.5—2℃，

0.025 微克/公斤体重是精制內毒素的最小发热量。

表 2 大腸杆菌內毒素的家兔 *Shwartzman* 反应半数皮肤預备剂量 (SPD_{50})

制 备 物	局部 <i>Shwartzman</i> 反应的最小反应剂量 (微克)					SPD_{50} (微克)	可 信 限 ($p = 0.95$)
	兔 ₁	兔 ₂	兔 ₃	兔 ₄	兔 ₅		
大腸杆菌細胞	—	—	—	—	—	>10.00	—
粗制內毒素	10.00	1.25	5.00	10.00	2.50	3.25	±1.58
上清液提取物	—	10.00	—	—	—	>10.00	—
精制內毒素	1.25	2.50	2.50	5.00	0.62	1.40	±0.74

表 3 大腸杆菌內毒素的小白鼠半数致死量

制 备 物	每 组 动 物 死 亡 数*					LD_{50} (微克)	可 信 限 ($p = 0.95$)
	600微克	400微克	200微克	100微克	50 微克		
大腸杆菌細胞	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	>600	—
粗制內毒素	3/5	2/5	1/5	0/5	0/5	372	±181.6
上清液提取物	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	>600	—
粗制內毒素	4/5	3/5	2/5	0/5	0/5	283	±108.8

* 分母是每组动物数;分子是每组动物死亡数。

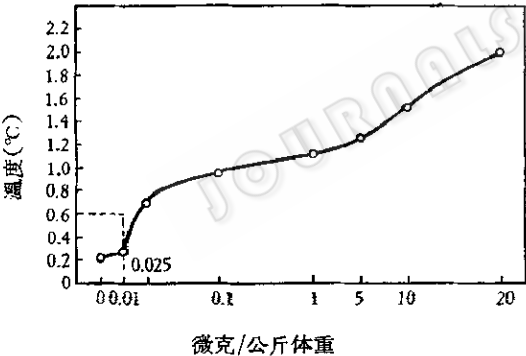


图 2 大腸杆菌精制內毒素的剂量与热原反应的关系
每组家兔靜脉注射: 20, 10, 5, 1, 0.1, 0.025 及
0.01 微克內毒素后的体温升高平均值。 右下側虛线
表示正常体温波动范围。

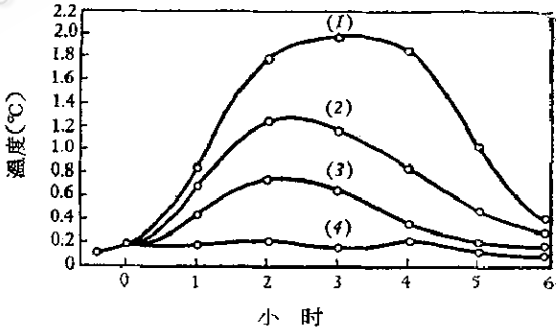


图 3 大腸杆菌精制內毒素的热原反应曲线
家兔靜脉注射剂量(每公斤体重):
(1) 20 微克; (2) 5 微克; (3) 0.025 微克;
(4) 0.01 微克。

討 論 及 結 論

本文报告是根据 Westphal 的方法结合本实验室条件加以简化, 用来提取大腸杆菌內毒素所获得的结果。在提纯精制步骤中采用高速离心 (20,000 rpm), 代替超速离心并在高速离心之前用煮沸法以除去制备物內的蛋白质。根据化学分析、光谱分析及毒性试验结果证明, 此种精制內毒素的纯度尚能满足毒性作用研究的要求。虽然纯度尚不及 Westphal 的结果^[9], 但较其他作者^[10-12]的结果要高得多。说明此种简化方法具有一定的实际意义。

参 考 文 献

- [1] 谢少文: 免疫学问题, 37 页, 吉林医科大学出版, 1963。
- [2] 谢少文, 余瀛主编: 免疫学进展, 上海科技出版社, 1962。
- [3] 余瀛, 臧人杰: 上海市微生物学会专题报告及论文摘要集, 6 页, 上海市微生物学会出版, 1962。
- [4] 谢彦博: 免疫学问题, 11 页, 吉林医科大学出版, 1963。
- [5] Westphal, O. et al.: *Z. Naturforsch.*, 7b:148, 536, 584, 1952.
- [6] Tauber, H. et al.: *Exp. Med. Surg* 19:161, 1961.
- [7] Tauber, H. et al.: *J. Biol. Chem.*, 235:961, 1960.
- [8] 顾汉颐: 生物检定讲义, 上海科技出版社, 1958。
- [9] Westphal, O. et al.: *Angewand. Chem.*, 66:407, 1954.
- [10] Takeda, Y. et al.: *Jap. J. Exp. Med.*, 25:1, 1955.
- [11] Whittet, T. D.: *J. Pharm. Pharmacol.*, 6:304, 1954.
- [12] Zablocki, B. et al.: *Acta Microbiol. (Poland)* 4:167, 1955.

PREPARATION AND BIOLOGICAL ASSAYS OF *ESCHERICHIA COLI* ENDOTOXIN

YU CHUANG, CHO LU-SIN, AND FANG ZHI-YUNG

By making use of the phenol-water extraction procedure of Westphal and Tauber, endotoxin was isolated and purified from acetone-dried *E. coli* cells. The crude endotoxin thus prepared contained, in addition to endotoxin, large amounts of nucleic acids and nitrogenous substances. Attempts were made to remove most of these substances from the crude endotoxin by heating (boiling) and by high speed centrifuge (20,000 rpm.). After this treatment, the purified product obtained composed mainly of endotoxin with low nitrogen and phosphorus contents, while most of nucleic acids were removed. In a quantitative study by local Shwartzman reaction, 1.4 ug. of the purified endotoxin was effective to serve as a 50% preparatory dose (SPD₅₀). The LD₅₀ for mice was 283 ug. and the minimum pyrogenic potency for the rabbit was 0.025 ug./kg.