

用胰酶消化法浓缩纯化恙虫病立克次体

邢 祖 培*

(北京市房山县卫生防疫站, 北京房山)

用不同感染材料和方法进行了浓缩纯化恙虫病立克次体的试验。结果证明以 0.25% 的胰蛋白酶消化感染鸡胚卵黄囊膜, 可获得形态完整的立克次体; 浓缩纯化的立克次体保持活性; 用于补体结合试验, 抗原滴度可达 1:128。经冰冻干燥保存后, 仍能保持其形态的完整性。

恙虫病立克次体比较脆弱, 不易浓缩和纯化。1956 年刘守仁报道了从感染鸡胚卵黄囊膜提纯恙虫病立克次体, 用 30% 蔗糖为保护液, 加乙醚处理, 得到较满意结果^[1]。为获得形态完整而纯净的恙虫病立克次体, 以期用于补体结合试验的抗原, 并为探索制造疫苗做准备, 我们进行了恙虫病立克次体浓缩纯化的研究。

浓缩纯化方法的比较

一、差速离心浓缩纯化恙虫病立克次体

(一) 感染的鸡胚卵黄囊膜

取 7 日龄感染的莱亨鸡鸡胚卵黄囊膜, 经镜检含大量立克次体而无杂菌者, 在含有玻璃珠的瓶中摇碎, 按每个鸡胚卵黄囊膜加入 7.5% 蔗糖缓冲液 10 毫升为原液。

(二) 感染的小白鼠肺脏

将感染的鸡胚卵黄囊膜 1:10 悬液离心(2000 转/分) 10 分钟, 取上清液接种体重 12—14 克小白鼠尾静脉, 并同时接种鼻腔, 4—5 天后发病, 解剖取肺, 经镜检将含大量立克次体者, 在乳钵中研磨, 为更好的保护立克次体, 按每个鼠肺加入 30% 蔗糖缓冲液 2 毫升为原液。

将以上两种原液分别离心(2000 转/分) 10 分钟, 取其上清液, 再离心(5000 转/分) 2 小时, 取其沉渣, 然后用 30% 蔗糖缓冲液按 1/10 量浓缩制成悬液。

二、乙醚浸渍法

取 7 日龄感染的莱亨鸡鸡胚卵黄囊膜, 感染的小白鼠肺脏和按一般方法制备并感染的鸡胚成纤维细胞镜检, 将含大量立克次体者研碎, 用 30% 的蔗糖缓冲液按 1:10 制成悬液, 再分别加等量的 20% 甲醇乙醚混合液(即 20 毫升的甲醇加乙醚到 100 毫升), 振荡后放 4℃ 冰箱中过夜。翌日可见分成 3 层, 取其水层, 离心(5000 转/分) 2 小时, 将沉渣以 7.5% 蔗糖缓冲液按 1/10 量浓缩。

三、胰酶消化法

取 10% 的胰酶, 用 pH 7.6 的 Hanks 氏液稀释成 0.25%, 按每个感染的鸡胚卵黄囊膜加入 3 毫升, 放 37℃ 水浴中消化 30 分钟。取出用毛细管吹打 20—30 次, 然后用 7.5% 蔗糖缓冲液稀释 3 倍, 离心(2000 转/分) 10 分钟, 除掉组织块, 取上清液离心

本文于 1975 年 4 月 10 日收到。

* 本工作是在北京生物制品所进修时所作, 承赵树萱和邵兰同志帮助和指导, 特此致谢。

(5000 转/分)2 小时,其沉渣按每个鸡胚卵黄囊膜加入 7.5% 蔗糖缓冲液 1 毫升稀释。

以上 3 种浓缩纯化方法的结果,均以

立克次体的形态,有无杂质,比较其优劣,结果列于表 1。

表 1 3 种浓缩纯化恙虫病立克次体的方法比较

方 法	材 料	每视野立克次体数	浓缩纯化后稀释度	结 果		
				立克次体数/每视野	形 态	杂 质
差 速 离 心	卵 黄 囊 膜 鼠 肺	50—100	1 个/1 毫升	1—10	不 整 齐	有
		10—50	1 个/0.2 毫升	0—1	不 整 齐	有
乙 醚 浸 渍	卵 黄 囊 膜 鼠 肺 成纤维细胞	50—100	1 个/1 毫升	1—10	较 整 齐	有
		50—100	1 个/0.2 毫升	1—10	不 整 齐	有
		10—50	300 厘米 ² 单层/0.4 毫升	0—1	不 整 齐	有
胰 酶 消 化	卵 黄 囊 膜	50—100	1 个/1 毫升	7100	圆	少

从表 1 结果可以看出,3 种浓缩提纯方法中以胰酶消化法结果较为满意。用该法浓缩纯化的立克次体,数量多,杂质又少,仅形态有所改变,呈圆形。

胰酶消化法的进一步实验

为了使胰酶消化感染卵黄囊膜时保持立克次体的完整形态,杂质更少,对其有关特性进一步作了研究。

一、胰酶消化时间、温度和稀释液对浓缩纯化的影响

用 Hanks 氏液、7.5% 和 30% 的蔗糖缓冲液,分别在 37℃ 水浴消化 30 分钟和 37℃ 水浴消化后放 4℃ 冰箱过夜进行试验(表 2)。

表 2 结果表明,感染的鸡胚卵黄囊膜用 30% 蔗糖缓冲液稀释,在 37℃ 水浴消化 30 分钟,再经 4℃ 冰箱过夜,使之在较低温度环境中继续起消化作用,可消化完全。该消化液经差速离心后,可获得大量形态完整的立克次体,镜检无杂质(照片 1,2)。

表 2 不同消化条件浓缩纯化恙虫病立克次体的结果

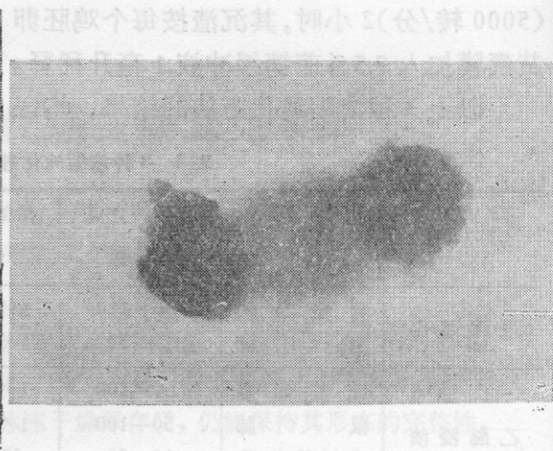
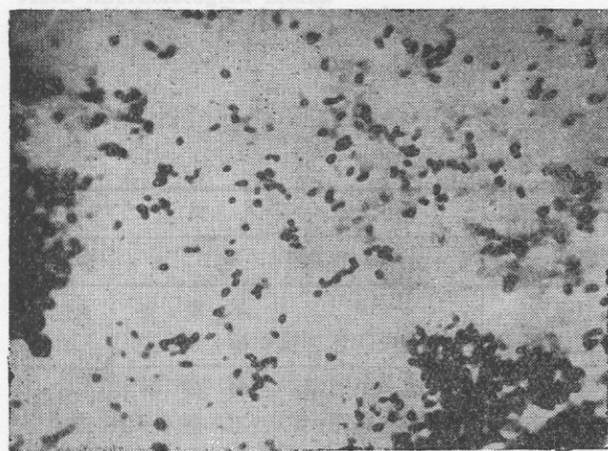
试验次数	稀 释 液	消化时间(分)和温度		结 果		
		37℃ 水浴	4℃ 冰箱	每视野立克次体数	形 态	杂 质
1	Hanks 氏液	30	—	>100	圆	少
	7.5% 蔗糖缓冲液	30	—	>100	圆	少
	30% 蔗糖缓冲液	30	—	>100	较整齐	极少
	30% 蔗糖缓冲液	30	过夜	>100	完整	无
2	30% 蔗糖缓冲液	30	—	>100	较整齐	极少
	30% 蔗糖缓冲液	30	过夜	>100	完整	无
3	30% 蔗糖缓冲液	30	—	>100	较整齐	极少
	30% 蔗糖缓冲液	30	过夜	>100	完整	无

二、浓缩纯化的立克次体保持完整形态的时间

把纯化的立克次体悬液按 0.3% 加入福尔马林灭活,同不加任何灭活物质或防腐剂比较,放置 4℃ 冰箱中分别立即取样,然后再于第 5 天和第 10 天取样涂片检查。结果除立即检查者外,均不能保持立克次体的完整形态。

三、浓缩纯化立克次体的冷冻真空干燥试验

由于立克次体的形态不易保持,故进



纯化浓缩的恙虫病立克次体

1. 显微镜照片(1500×) 2. 电子显微镜照片(50000×)

(中山医学院病理教研组摄制)

行了冷冻真空干燥实验。将用 30% 蔗糖缓冲液稀释的浓缩纯化立克次体悬液, 按每安瓿 0.5 毫升分装, 放 -40°C 过夜, 次日真空抽气 8—9 小时, 真空度保持 $31-5 \times 10^{-2}$ 毫米水银柱, 干燥后真空封固。隔一定时间启开安瓿, 检查其形态及补体结合试验抗原滴度。

表 3 冷冻干燥浓缩纯化立克次体的保存时间

检查时间	形 态	补体结合试验抗原滴度
冷冻干燥前	典型完整	1:128
冷冻干燥后	典型完整	1:64
室温保存 3 个月	典型完整	1:64
室温保存 6 个月	典型完整	1:64

表 3 结果表明, 冷冻干燥后浓缩纯化的立克次体可保持完整形态, 其补体结合试验抗原滴度比冷冻干燥前稍微降低。

四、灭活方法对浓缩纯化立克次体补体结合试验抗原滴度的影响

把浓缩纯化的立克次体悬液, 分别用 0.3% 福尔马林, 1:5000 硫柳汞和在 56°C 加热处理 30 分钟, 然后测定补体结合反应抗原滴度。

表 4 浓缩纯化立克次体经不同方法处理对补体结合试验抗原滴度的影响

处 理 方 法	补体结合试验抗原滴度
立克次体悬液	1:128
0.3% 福尔马林	1:64
1:5000 硫柳汞	1:128
56°C 30 分钟	1:128

表 4 的结果表明, 除用 0.3% 福尔马林处理外, 其他方法均对补体结合抗原滴度无影响。

五、浓缩纯化后的立克次体对小白鼠的毒力试验

把用胰酶消化法浓缩纯化的立克次体悬液接种体重 12—14 克小白鼠腹腔, 每只 0.2 毫升, 接种 5 只。结果均于 4 天发病, 5 天死亡。把腹膜涂片镜检, 可见典型的立克次体。虽然我们未做 LD_{50} 滴定, 但说明消化后仍有立克次体活存。

六、用胰酶法消化立克次体感染小白鼠肺脏和鸡胚成纤维细胞的实验

考虑到胰酶消化法是否可用于小白鼠

肺脏和鸡胚成纤维细胞的立克次体材料, 而进行了试验。结果表明, 均未能使立克次体保持完整形态。

讨 论

1. 关于浓缩纯化恙虫病立克次体问题。除 1956 年刘守仁用乙醚浸渍法外, 1958 年 Kawamura^[2] 1965 年 Kobayashi^[3] 相继用离子交换树脂纯化恙虫病立克次体, 但尚不能同时作出恙虫病立克次体的可溶性和颗粒性抗原, 其应用范围是有限的。1969 年 Kobayashi^[4] 又用离子交换树脂 (Amberlite XE64) 及超高速沉淀法试制成纯化的恙虫病立克次体的颗粒抗原, 并能用于分型诊断, 但此法要求高价特别设备, 而且手续复杂, 滴度不高, 仍不能令人满意。我们采用胰酶消化法, 只需要普通离心机, 便可制出颗粒性抗原, 补体结合试验的抗原滴度达 1:128。但在普通冰箱中不易保存完整的形态。作者曾于 1956 年和 1965 年报告了冷冻真空干燥保存法^[5,6] 把浓缩纯化的恙虫病立克次体进行冻干实验的结果证明, 冻干后可保存较长时间。因此, 初

步认为, 此种浓缩纯化和保存方法是可以采用的。

2. 用胰酶消化法纯化 Q 热立克次体早有报告^[7]。一般认为恙虫病立克次体比较脆弱一经消化则必会变形, 为保持立克次体形态完整, 必须设法保护抗原不受胰酶消化影响。我们采用 30% 蔗糖缓冲液^[1], 达到了既能用胰酶消化卵黄囊膜组织, 又可保护立克次体。实验还证明, 为保护立克次体的完整性, 30% 蔗糖缓冲液是优于 7.5% 蔗糖缓冲液的。

3. 用胰酶消化卵黄囊膜后浓缩纯化的恙虫病立克次体, 能否用于制备疫苗以及立克次体的分型, 需要进一步研究解决。

参 考 资 料

- [1] 刘守仁: *Virus*, 4:318, 1956.
- [2] Kawamura, A.: *Jap. Exper. Med.*, 28: 317, 1958.
- [3] Kobayashi, Y. et al.: *J. Immunol.*, 95:412, 1965.
- [4] Kobayashi, Y. et al.: *Amer. J. Trop. Med. Hyg.*, 16: 942, 1969.
- [5] 邢祖培、黄珍华: *微生物学报*, 4: 185, 1956.
- [6] 邢祖培: *微生物学报*, 11(1): 147, [1965].
- [7] Linde, K. and Urbach, H.: *Acta Virol.*, 7: 90, 1963.

PURIFICATION AND CONCENTRATION OF *RICKETTSIA TSUTSUGAMUSHI* BY TRYPSIN DIGESTION

Xing Zupei

(Fangshan Health Station, Beijing)

A modified method for the purification and concentration of *Rickettsia tsutsugamushi* has been devised. It consists of treatment of *Rickettsia* grown in chicken embryo yolk sac with 0.25% trypsin in the presence of 30% sucrose. When compared with the methods pre-

viously employed, this modified method has been found superior in preserving the morphology and the antigenicity in the complement fixation test. These properties could be preserved for at least 6 months when the preparation was lyophilized and stored in refrigerator.