

# 布鲁氏菌变态反应原的研究

## 1. 蛋白变应原的提取和检测

黄 建 王 菱 章

(卫生部药品生物制品检定所,北京)

用粗糙型布鲁氏菌 B115 菌种制成浓菌液,丙酮脱水,高浓盐溶液处理,离心去渣,上清用酒精沉淀,制成粗提液;再过 Sephadex G100 柱,用致敏豚鼠证明第 2 峰液 ( $P_2$ ) 为特异性变应原。聚丙烯酰胺电泳测定为单一成份;用致敏豚鼠作皮肤试验,48 小时  $P_2$  组平均值为: 14.7—23.2mm; 布鲁氏菌素组为: 7.5—12.2mm, 用致敏家兔作皮肤试验,  $P_2$  组为 19.2—22.4 mm; 菌素组为 0—16.8mm, 初步证明  $P_2$  具有较好的变态反应原性。

**关键词** 布鲁氏菌;蛋白质变应原;提纯

自 1922 年 Burnet 首次用皮肤试验诊断人的布鲁氏菌病六十多年来,不少布鲁氏菌病工作者试制了各种类型的变态反应原,但大都处于实验室研究阶段<sup>[1,2]</sup>。目前,国内外在人体广泛应用的有布鲁氏菌素 (Brucellin) 和布鲁氏菌变态反应原 (Brucel-lergen)。由于这类制品在使用时常可对已致敏机体引起较强烈反应,甚至有时还出现非特异性反应,在判定结果上又缺少统一标准。近年来国外有些学者开始了布鲁氏菌蛋白变应原 (Brucella Protein Allergen-BPA) 的试制工作,并报道它具有敏感性高、反应性小的特点<sup>[3,4]</sup>。为了提高我国布鲁氏菌皮试抗原的敏感性和减轻其对机体的反应性,我们首次探讨了本制品的提纯技术,并对其主要生化特性和生物学活性作了检定,初步证明它对致敏动物的敏感性优于布鲁氏菌素。

## 材 料 和 方 法

### (一) 菌种

粗糙型羊种布鲁氏菌 B115 菌株,本所冻干

保存菌种。

### (二) 培养基

肝浸液琼脂克氏瓶,含糖量为 0.4%(W/V)。

### (三) 缓冲液

三羟甲基氨基甲烷(Tris),北京化工厂制造。用蒸馏水配成 pH8.0 HCl-Tris 液。

### (四) 试剂

Sephadex G100 进口分装(瑞典)。

### (五) 制备方法

1. 菌液: 冻干菌种启开后,第二代培养物做种子,接种肝琼脂克氏瓶,37℃ 培养 72 小时,刮种于生理盐水中,制成浓菌液,并作纯菌试验,合格后备用。

2. 菌粉制备: 将菌液及丙酮同时放入 -20℃ 冰箱。两小时后取出菌液放 37℃ 使融冻,菌液中加入 3 倍体积的冷丙酮,放冰箱 20 小时,取出于 3000rpm 30 分钟离心,去上清,再用丙酮洗 3 次,弃上清,放 37℃ 干燥 18 小时即成菌粉,存放在灭菌干燥小瓶内,并用橡皮塞塞紧瓶口,存放冰箱备用。

3. 高盐菌液制备: 取菌粉 15g,加 300ml 2.5% NaCl 溶液,搅拌约 32 小时,于 20,000rpm 离心

本文于 1984 年 11 月 20 日收到。

30 分钟,取上清约 300ml, 放冰箱,同时将酒精放冰箱, 4 小时后, 300ml 上清液中加入 1000ml 冷酒精, 再放冰箱, 取出后离心 (20000rpm, 30 分钟), 弃上清, 沉淀物用 HCl-Tris 液洗下为粗提物, 装入灭菌胶塞瓶内。

4. 层析: 玻璃柱为 100×2.5cm, 装入新处理的 Sephadex G100 液, 用 HCl-Tris 液为缓冲液, 加入粗提物 3ml, 过柱。流出 100ml 后开始用自动收集器收集洗脱液, 凝胶柱流速为每 10 分 1 管, 每管约 5ml。共收集约 100 管。

5. 光密度测定: 用分光光度计于 280nm 测定各管洗脱液的吸光度(A)。绘制成图 1。

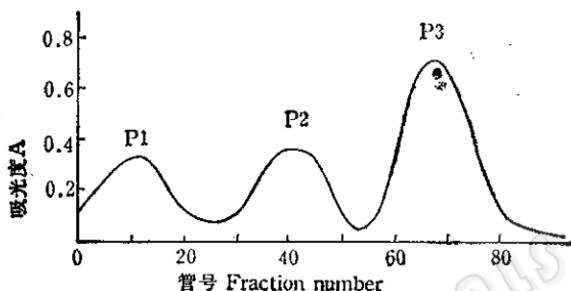


图 1 布鲁氏菌粗提液的 Sephadex G100 柱层析  
Fig. 1 Chromatography of Brucella extract on sephadex G100 column

图像显示出三个峰, 将 13—24 管洗脱液合并为 1 峰液 (P<sub>1</sub>); 32—50 管合并为 2 峰液 (P<sub>2</sub>); 将 60—70 管合并为 3 峰液 (P<sub>3</sub>)。

6. 浓缩与透析: 将合并的 P<sub>1</sub>、P<sub>2</sub>、P<sub>3</sub> 分别

放于玻璃纸袋内。用电扇吹风进行浓缩, 浓缩至原体积的 1/5—1/10。于 4℃ 用蒸馏水透析, 而后除菌, 分装于灭菌胶塞小瓶内, 放 4℃ 以下冻结, 保存备用。

## 结果和讨论

### (一) B115 菌株的形态和毒性

B115 菌种在菌型鉴定中属于典型的羊 I 型菌特性, 对三胜黄素产生 (++++) 凝集现象, 与粗糙型血清凝集良好, 符合粗糙型菌种的特性, 以光滑型 104M 为对照, 于电子显微镜下 (放大 67200 及 80000 倍) 作了菌体形态学观察, 从电镜图像中发现, 其胞壁似较薄, 光滑型 104-M 菌的胞壁似较厚 (见图 2-A 和 2-B)。

以小鼠 LD<sub>50</sub> 法测定 B115 的毒力, 也以 104M 为对照, 结果见表 1:

表 1 小鼠的 LD<sub>50</sub> 测定  
Table 1 The test of mice LD<sub>50</sub>

菌 种 Strains	LD <sub>50</sub> × 10 <sup>8</sup> 菌数 (cells)
M. B115	18.94
A. 104M	1.62

从表中看出: 104M 菌株的毒力是 B115 菌株的 11.6 倍。



图 2-A R-型 B115 菌株电镜图片  
Fig. 2-A Electron micrograph of B115 R-strain



图 2-B S-型菌株电镜图片

Fig 2-B. Electron micrograph of 104 M S-strain

表 2 致敏豚鼠的皮肤试验

Table 2 Skin tests of sensitized guinea pigs

小时(h)	P <sub>1</sub>	P <sub>2</sub>	P <sub>3</sub>	盐水 Saline
24	9.0	21.0	12.8	2.5
48	0	23.2	1.8	0

平均值 (mm)      Mean value (mm)

## (二) 层析组份的特异性检测

1. 三组份的蛋白含量测定: 先用牛清蛋白配成每毫升含 20、40、60、80 和 100 $\mu$ g 溶液, 用分光光度计于 280nm 测出各稀释蛋白液的吸光度(A)值, 绘成标准曲线, 再将 P<sub>1</sub>、P<sub>2</sub> 和 P<sub>3</sub> 作适当倍数的稀释, 测出其蛋白含量。分别为: P<sub>1</sub> = 780 $\mu$ g/ml; P<sub>2</sub> = 630 $\mu$ g/ml; P<sub>3</sub> = 410 $\mu$ g/ml。

2. 对致敏豚鼠特异性测定: 用布鲁氏菌活菌苗免疫豚鼠 30 只, 2 个月 after 分别用 P<sub>1</sub>、P<sub>2</sub> 和 P<sub>3</sub> 作皮试。即先将三个组分浓度调整到大致每毫升含量相同的浓度, 再分别以 0.1ml 于背部脱毛处皮内注射, 于 24 和 48 小时观察反应, 计算三组反应平均值, 结果如表 2。

从表中看到, 洗脱液致敏原特异性成份, 主要存在于 P<sub>2</sub> 中, 48 小时的结果更为明显。

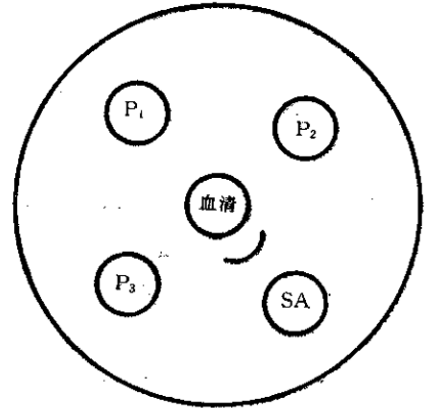


图 3 提纯布鲁氏菌蛋白双扩散

Fig. 3 IDD of purified Brucella Protein

中央孔: 布鲁氏菌血清 Central well: Anti Brucella serum

P<sub>1</sub>孔: 1峰组分 well P<sub>1</sub>: Fraction peak 1

P<sub>2</sub>孔: 2峰组分 Well P<sub>2</sub>: Fraction peak 2

P<sub>3</sub>孔: 3峰组分 Well P<sub>3</sub>: Fraction peak 3

SA孔: 菌体抗原 Well SA: Whole cell antigen

3. 琼脂双向扩散试验：用诊断血清作三个组分的双向扩散测定,见图 3。

从图中看出  $P_1$ 、 $P_2$  和  $P_3$  与布鲁氏菌诊断血清均不出现沉淀线,表明其中没有与该血清相应的表面抗原,而对照菌体抗原与血清之间出现 1 条明显沉淀线。

4. 聚丙烯酰胺凝胶电泳测定：用  $P_1$ 、 $P_2$ 、 $P_3$ 、粗提物、牛清蛋白等样品,作圆盘电泳试验,结果如图 4-A。

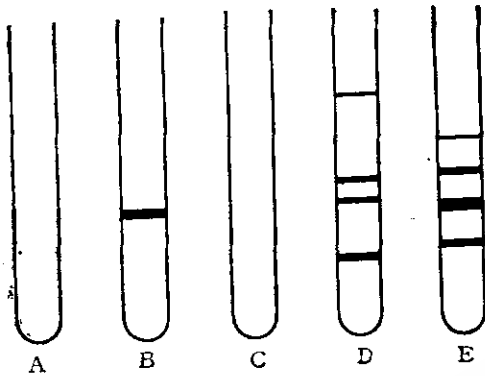


图 4-A 聚丙烯酰胺凝胶电泳图

Fig. 4-A Polyacrylamide gel electrophoresis pattern

- A: 组分  $P_1$ ; B: 组分  $P_2$ ; C: 组分  $P_3$ ;
- D: 99 号菌可溶性抗原; E: 牛清蛋白
- A: Fraction  $P_1$ ; B: Fraction  $P_2$ ; C: Fraction  $P_3$ ;
- D: Soluble antigen of strain 99;
- E: Bovine albumin

从图 4-A 圆盘电泳测定结果可看出： $P_1$  和  $P_2$  未见,  $P_3$  只有 1 个区带,粗提物和牛清蛋白各有 4 个区带。说明  $P_2$  为较均一性成分,而后两个样品含多个抗原成分。

继之作了复试,用  $P_2$ 、布鲁氏菌诊断血清、抗布鲁氏菌 IgG 及布鲁氏菌溶菌素等

样品。

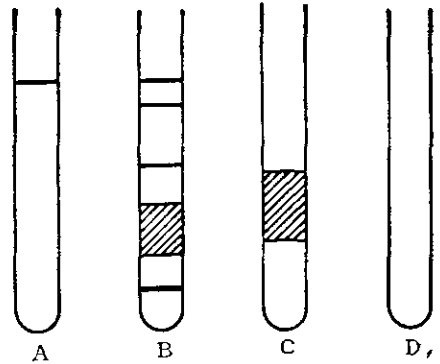


图 4-B 聚丙烯酰胺凝胶电泳图

Fig. 4-B Polyacrylamide gel electrophoresis pattern

- A: 组分 2; B: 布鲁氏菌血清; C: 抗布鲁氏菌 IgG; D: 布鲁氏菌溶菌素
- A: Fraction  $P_2$ ; B: Anti-Brucella serum;
- C: Anti-Brucella IgG; D: Brucelizate.

从复试图 4-B 结果看出： $P_2$  和 IgG 都只有 1 个区带,血清样品有 5 个区带,溶菌素未出现,可能用量过少。但  $P_2$  结果与图 4-A 一致,证明它只有 1 个成分。即变态反应原特异性成分。

### (三) $P_2$ 对致敏动物的敏感性

为了测定  $P_2$  的敏感性,选用豚鼠和家兔各 20 只,分期用产生超敏反应强的布鲁氏菌 104M 活菌苗和产生超敏反应弱的布鲁氏菌 P. I. 纯化苗(酚不溶性粗提物)对动物进行免疫。经免疫后约 3 个月,用  $P_2$  作为变态反应原,于动物背部脱毛处皮内注射 0.1ml (含蛋白 63  $\mu$ g),并以布氏菌素和生理盐水作为对照,分别对致敏动物作皮肤变态反应。

表 3 致敏豚鼠的变态反应 (mm)

Table 3 Allergic reaction of sensitized g. pigs (mm)

菌 苗 Vaccines	24h			48h		
	$P_2$	A	B	$P_2$	A	B
104M	21.0	8.5	2.5	23.2	12.2	1.0
P. I.	11.3	6.8	0	14.7	7.5	0

A: 布鲁氏菌素 Brucellin; B: 生理盐水 Saline.

表 4 致敏家兔的变态反应

Table 4 Allergen reaction of sensitized rabbits (mm)

菌 苗 Vaccines	24h			48h		
	P <sub>2</sub>	A	B	P <sub>2</sub>	A	B
104M	21.8	18.5	0	22.4	16.8	0
P. I.	21.7	5.8	0	19.2	0	0

1. 豚鼠皮肤试验: 结果见表 3。

从表 3 看出, 不论 24 或 48 小时, P<sub>2</sub> 组出现的变态反应强度均高于布鲁氏菌素组。说明其敏感性较强; 同时, 还看出 104M 活菌苗对豚鼠的致敏性高于 P. I. 苗。

2. 家兔皮肤试验: 结果见表 4。

从表 4 看出, 致敏家兔的结果与豚鼠的基本一致。

以上结果表明, B115 菌种是属于毒力低、菌体胞壁结构显示有改变的粗糙型羊种生物 1 型菌, 有利于用以制造蛋白成分为主的变态反应原。

目前国际上用作布鲁氏菌变态反应原的种类很不统一, 如苏联和我国为布鲁氏菌素, 美国用布鲁氏菌变态反应原<sup>[6]</sup>, 法国用羊种菌液或 P. I. 组分。而且没有公认的判定标准, 其敏感性均不高。我们经过初步摸索, 制出布鲁氏菌蛋白纯化物——P<sub>2</sub>, 它是一种均质性蛋白质, 对致敏动物有较好的特异性和敏感性, 与 P<sub>1</sub> 和 P<sub>3</sub> 相

比, 它是较纯的; 与菌相比, 它是敏感的。动物试验初步证明, 它是一种较好的变态反应原, 可用作布鲁氏菌皮试抗原。

但应指出的是: 虽然 P<sub>2</sub> 对致敏动物产生的变态反应优于菌素, 如与结核菌素或 PPD 相比, 其产生的红肿和硬结强度仍较弱。在理论上布鲁氏菌引起的与结核菌的同属于第 IV 型超敏反应, 而皮试反应出现的差异性可能有多种原因, 但就我们研究布鲁氏菌蛋白变应原来说, 应考虑如何进一步纯化或提高其活性。

## 参 考 文 献

- [1] Casdanda M. R.: *Bull. WHO* 9: 39, 1953.
- [2] Olitzki A. L.: *Immunobiological Methods in Brucellosis research (Part II)*, p. 69, 1970.
- [3] Brongblichate N. et al.: *J. Inf. Dis.*, 122(2): 70, 1970.
- [4] Jones L. M. et al.: *Biol. Exp. Path.* 54(5): 49, 1973.
- [5] Spink W. et al.: *Bull. WHO* 26: 409, 1962.
- [6] Simone B. et al.: *Immunology*, 31(5): 717, 1976.

# STUDIES ON ALLERGEN OF *BRUCELLA*

## I. FRACTIONATION AND ASSAY OF *BRUCELLA* PROTEIN ALLERGEN

Huang Jian Wang Lingzhang

(National Institute for the Control of Pharmaceutical and Biological Products, Beijing)

Dark solution of cells was prepared from culture of *B. melitensis* B115 strain, dehydrated by acetone, treated with an excess of sodium chloride, and precipitated with alcohol. The extracts were filtrated on a column of sephadex G100. Determinating with sensitized guinea pigs, the elution of peak 2 was specific allergen. Analysis with polyacrylamide gel electrophoresis was shown that it was a simple zone. At 48 h, results of skin test appeared that the mean volume was 14.7—23.2 mm

in Peak 2 group and 7.5—12.2 mm in Brucellin group with sensitized guinea pigs; and it was 19.2—22.4 mm in Peak 2 group and 0—16.8 mm in Brucellin group with sensitized rabbits. Preliminarily, it was showed that the B. protein allergen was better than Brucellin.

### Key words

*Brucella*; Protein allergen; Purification