

布鲁氏菌变态反应原的研究

III. 无外源蛋白菌素的试制和检测

黄建 杨静华 马丽君

(中国药品生物制品检定所, 北京)

用无外源蛋白的液体合成培养基制备布氏菌素, 猪种和羊种布氏菌均能生长, 但牛种菌不长。液体培养基中糖含量以 1.0%—2.5% 为好; 间歇搅拌培养优于静止培养, 其菌液浓度比静止培养高 2—11 倍; 培养时间 14 天与 25 天的结果相近; 猪种菌较羊种菌易于繁殖; 对致敏豚鼠的皮肤试验, 与现用的成品菌素相近或稍次, 能引起明显的变态反应。

关键词 布鲁氏菌; 新布氏菌素; 合成培养基

为能用一种类似菌素的经典方法进行生产, 又能排除其中的异性蛋白, 使其制备的变应原经处理后能定量应用, 并无非特异反应。我们试制了无外源蛋白培养基培养细菌, 获得与经典方法相似的新菌素, 并引起致敏动物的变态反应。这项工作国内外尚未见报道。

材 料 和 方 法

(一) 菌种

猪种布鲁氏菌 S2(55007)、牛种布鲁氏菌 A4(55004)、羊种布鲁氏菌 M5(55009)。均为本所库存参考菌种, 用前启开冻干安瓿。

(二) 培养基

成分: 氨基酸含量 (mg/ml): DL-Alanine 1.2, L-Arginine 0.77, L-Cystine 0.1, L-Glutamic acid 3.9, L-Lysine-HCl 0.77, DL-Methionine 0.94。

微量化合物及维生素等 (mg/ml): $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 2.28, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.62, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.0139, $MnSO_4 \cdot H_2O$ 0.0169, Nicotinic acid 0.002, Thiamin HCl 0.00015, d-Glucose 25。

制备: 除葡萄糖外, 将上述各成分混合, 调 pH 为 7.4, 10 磅灭菌 20 分钟。葡萄糖可除菌过滤或单独平压灭菌, 用前按试验需要加量。

(三) 豚鼠

体重 200—250g, 白毛豚鼠, 用布氏菌活菌苗免疫, 每只皮下注射 10 亿菌, 3 个月后开始作皮肤试验。如时间过长, 于 6 个月后做加强免疫接种, 剂量减半。

(四) 对照菌素

为兰州生物制品研究所当年生产的成品菌素。

(五) 菌素培养

将二代胰蛋白胨琼脂培养物制成菌液, 接种于无外源蛋白液体培养基中, 37℃ 培养。静止培养于 37℃, 到期终止培养; 振荡培养则置磁力搅拌器上搅拌 2 小时, 每日二次, 然后放 37℃ 培养, 除菌取滤液。

(六) 培养物浓度测定

将上述二种液体培养基经 80℃ 1 小时灭菌, 于 5000r/min 离心, 弃去上清液, 用酚盐水将沉淀制成悬液, 比浊, 计算每毫升含菌数。

(七) 皮肤试验

将致敏豚鼠背部脱毛, 每只动物皮内注射试制样品 0.1ml, 分别于 24 和 48 小时测红肿反应, 计算方法见文献 [2]。

本文于 1985 年 10 月 29 日收到。

(八) 生化分析

主要用凯氏微量定氮法测总氮；Folin 酚法测蛋白含量^[3]。

结 果

(一) 影响生长的因素

1. 布鲁氏菌生长试验：用三个种的布鲁氏菌 48 小时培养物制成 10^9 /ml 菌液，在 4.5ml 每份液体培养基中加入 1 滴菌液（约含 5×10^7 菌），37℃ 培养，观察不同时间生长结果（表 1）。

羊种和猪种菌在此液体培养基上均能

表 1 不同菌种生长的比较

Table 1 Comparison for growing difference of Br. species

菌种 Strain	生长时间 Growing for hours			
	24	48	72	96
牛种布鲁氏菌 <i>Br. abortus</i>	-	-	-	-
猪种布鲁氏菌 <i>Br. suis</i>	+	+	++	++
羊种布鲁氏菌 <i>Br. melitensis</i>	-	+	++	+++
对照 Control	-	-	--	-

(-) = 未长 No growing; (+)——(+++) = 生长 Growing

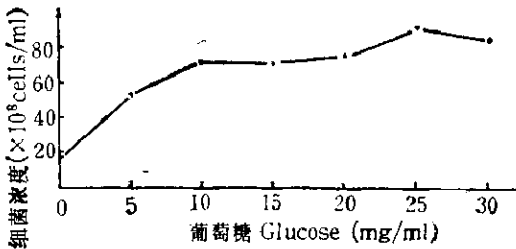


图 1 培养基中不同糖含量时细菌生长曲线
Fig. 1 Growth curve for the culture in LMFP containing different volume of glucose

生长，但牛种菌不长。

表 2 振荡和静止培养的比较

Table 2 Comparison of stirred and stable cultures

菌种 Strain	第 1 次 1st time		第 2 次 2nd time	
	振荡法 Stirred	静止法 Stable	振荡法 Stirred	静止法 Stable
猪种布鲁氏菌 <i>Br. suis</i>	386.8	3.4	165.5	22.5
羊种布鲁氏菌 <i>Br. melitensis</i>	502.6	37.1	51.5	21.8

单位 Unit = 10^8 cells/ml

2. 含糖量对细菌生长的影响：在液体培养基中加入葡萄糖，使其最后含量为 0.5%—3.0%，分别观察细菌生长浓度的变化。仅用羊种菌接种，37℃ 14 天后细菌生长曲线见图 1。

当糖含量 25mg/ml 时，细菌生长浓度达 91×10^8 菌/ml。下面试验含糖量控制在 10—25mg/ml。

3. 不同种间的生长浓度比较：用猪种菌和羊种菌接种培养，分别于不同时间测定细菌生长浓度。

猪种菌和羊种菌培养 5 天分别为 7.9 和 5.9×10^8 菌/ml；10 天分别为 21.0 和 11.9×10^8 菌/ml；15 天为 62.3 和 55.0×10^8 菌/ml；以后反有下降。两菌均以培养 15 天为好。

4. 振荡与静止培养生长浓度的结果见表 2。振荡培养细菌明显高于静止培养。

此外，还对振荡培养不同时间作了观察，结果见图 2。

培养时间延长，细菌生长浓度增高；14 天内，猪种菌呈对数上升，羊种菌于 10 天后平稳生长。

(二) 豚鼠皮肤试验

1. 第 1 次试验：制备 4 小批新菌素，

表 3 振荡菌素的皮肤试验
Table 3 Skin tests with stirred Brucellins

小时 (h)	B.a-1	S.B.a-1	S.B.a-2	S.B.m-1	S.B.m-2
24	18.2±2.0	13.0±0	15.8±1.9	12.3±1.2	14.0±1.7
48	16.5±2.2	9.0±1.0	11.5±1.5	10.7±3.2	11.0±4.0

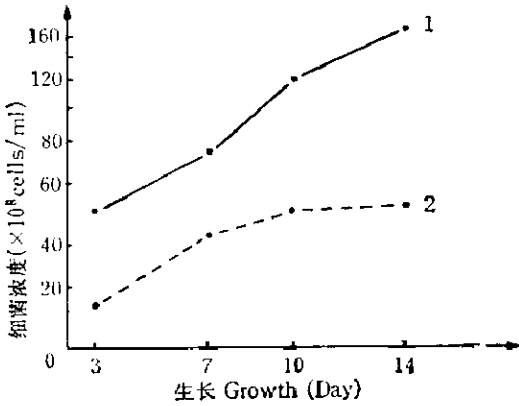


图 2 振荡不同时间细菌生长浓度
Fig. 2 Bacterial contents growing different days in stirring culture

- 1.猪种菌生长曲线
- 2.羊种菌生长曲线
- 1. Growth curve of *Br. suis*
- 2. Growth curve of *Br. melitensis*

分别用其原液(A)和 10 倍稀释液(B)对致敏动物做皮肤试验。24 小时 4 批菌素引起动物皮肤反应, A 组为: 11.6±2.8、10.2±3.2、10.8±1.8 和 11.5±1.0mm; B 组为: 9.3±3.0、8.8±1.5、8.8±1.1 和 5.8±3.6mm。48 小时 A 组为 5.1—6.2mm; B 组均已消失。

2. 第 II 次试验: 用前述 1、2、3 批新菌素与成品菌素作对比观察。每批做 10 倍 (B) 和 50 倍 (C) 稀释。24 小时动物的平均反应, B 组为: 6、9、9、13.5mm; C 组前 3 批为阴性反应, 仅成品菌素为 9.5mm。48 小时 B 组为: 7、3.5、9 和 8.5mm; C 组全为阴性反应。

3. 第 III 次试验: 用新菌素和成品菌

素各 2 批, 每批分为 4 组, 即 A 组(原液)、B 组(10 倍液)、C 组(50 倍液)和 D 组(100 倍液)。于 24 小时观察反应, 新 1-A 为 11.3±1.1mm, B 为 8.2±4.8; 新 2-A 为 9.1±2.3mm, B 为 3.2mm, 2-C 和 2-D 组均为阴性反应。成品菌素 1 各组反应为: 18.1±1.0、12.7±2.5、12±2、3.9mm, 成品菌素 2 各组反应为: 17.4±3.0、10.8±2.9、5.8、0mm。48 小时二批新菌素仅 A 组有反应为: 新 1-A 8.7, 新 2-A 2.8mm; 成 1-A 为 13±1.2, B 7.2±4.8, 成 2-A 为 13±1.2mm, B 为 8.4±4.9mm。其 C 和 D 均为阴性反应。

4. 第 IV 次试验: 用第 2 次振荡培养的 4 批新菌素与溶菌素进行比较。这 4 批新菌素包括猪种菌 2 批 (S.B.s-1 和 S.B.s-2), 羊种菌 2 批 (S.B.m-1 和 S.B.m-2), 由牛种菌制备溶菌素 (B.a-1)。各菌素均用原液, 结果见表 3。

表 4 新菌素的蛋白测定
Table 4 Assay for protein of new Brucellins

新菌素 New Brucellins	蛋白 (μg/ml) Protein	总氮 (mg/ml) Total N ₂
第 1 批 Batch 1	675	1.054
第 2 批 Batch 2	1600	—
第 3 批 Batch 3	900	1.075
菌液对照 Bact. solution	7750	—

“—”未测 No assaying

以溶菌素最佳,而制备的s和m型菌素基本相近。但强度优于静止培养的。

(三) 新菌素的总氮和蛋白含量

1. 新菌素成分测定: 共用新菌素第1、2、3批,并以菌液作对照。结果如表4。

2. 溶菌素成分测定结果见表5。

成品菌素蛋白含量最高,溶菌素的含量较高。这与变态反应的强度有关。

表5 溶菌素蛋白测定

Table 5 Assay for protein of Brucellazates

菌素种类 Preparations	蛋白 ($\mu\text{g/ml}$) Protein	总氮 (mg/ml) Total N ₂
溶菌素 (S) Brucellazates (S)	6466	—
溶菌素 (A) Brucellazates (A)	7667	—
成品菌素 Commercial Brucellin	9533	2.67

讨 论

(一) 无外源蛋白培养基的营养效果

布鲁氏菌对营养的要求选择性较高,需要在营养成分丰富的培养基上生长^[4]。我们所用的合成培养基也证明这一点,而且不同的种对氨基酸的需求有明显差别。

(二) 新菌素的性质

从致敏动物的皮肤试验中证明: 静止培养的各批新菌素用作变应原可以出现明显的红肿反应,于24小时观察,反应范

围为10—12mm,48小时明显降低,各批之间结果相近,但较成品菌素稍弱。说明新菌素有变应原活性。这为我们开辟了一条制备菌素的新途径。此法制备菌素既可排除外源性蛋白,又可按蛋白量定量接种,为菌素的质量改进和标准化创造了条件。但只能用原液做皮试,稀释10、50或100倍时,结果均不好。振荡培养制备的新菌素用作皮试时,较静止培养好。24小时反应可达13—16mm,而48小时仍可到10mm左右。与成品菌素的结果相近或稍弱。如改进振荡条件有可能提高。其次,我们从总氮和蛋白测定中看到,新菌素中的含量较成品菌素和溶菌素的含量低。而成品菌素和溶菌素的反应较强,可能与其本身蛋白量高有关。振荡培养的新菌素反应强度高于静止培养菌素;原液菌素高于稀释菌素;低倍者大于高倍者。说明反应强度与所用菌素含有的特异蛋白量有关。因此只要提高细菌生长浓度,便可提高蛋白含量,从而可能提高反应强度。

参 考 文 献

- [1] 生物制品规程: 布鲁氏菌素制造及检定规程 卫生部, IX2-01—03, 1979。
- [2] 黄建等: 中华微生物学及免疫学杂志, 2(4): 236—239, 1982。
- [3] 朱 俭等: 生物化学检验, 上海科学出版社, p. 56—65, 1981。
- [4] Corber, M.J. et al.: Methods for the identification of Brucella CVL England Booklet 2085, p.13—18, 1983。

STUDIES ON ALLERGEN OF *BRUCELLA*

III. PREPARATION AND ASSAY OF BRUCELLIN WITHOUT OUTSIDE PROTEIN

Huang Jian Yang Jinghua Ma Lijun

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

In this paper, it was first reported that Brucellin was successfully prepared with synthetic liquid medium without outside protein (LMFP). Preliminarily shown that *Br. suis* and *Br. melitensis* both have been grown, but *Br. abortus* hasn't. 10—25 mg/ml of glucose in it was suitable for the medium. Growth of *Br.* cells in stirring incubation could gain more multiplication than that in stable incubation. The concentration of the formel was higher 2—11 times than that of the latter. The preparations of Brucellin cultured for 14 days

was like that for 25 days. Multiplication of *Br. suis* seems to be easier than that of *Br. melitensis*. The new Brucellin used for skin test could produce apparent allergenic reaction in sensitized quinea pigs, but it just was more slightly weak than that of commercial Brucellin.

Key words

Brucella; New Brucellin; Synthetic medium