

# 从白喉棒状杆菌 PW8 株中筛选高产毒株

戎奋生 薛玉珍 孙景志

(卫生部北京生物制品研究所 北京 100024)

**关键词** 白喉棒状杆菌, 菌株, 培养基

**分类号** R378

在 19 世纪末, 由 Park 和 Williams 分离的白喉棒状杆菌 PW8 菌株, 此菌株是能产生高效价白喉毒素的菌株。1956 年从罗马尼亚引入我国的 PW8-weissensee 菌株也是 PW8 的传代株<sup>[1]</sup>, 它具有较高的自然变异性。为了防止发生变异, 我们采取了有效措施, 用逐步单个菌落筛选的新方法, 从原代白喉棒状杆菌菌株筛选出产毒能力更高的菌株, 为生产优质白喉类毒素制品创造了条件。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌种

白喉棒状杆菌 PW8-weissensee 株的冻干传代菌株 871-2-1 (本实验室保存)。

### 1.2 培养基

**1.2.1 菌种培养基 (%)**: 浓方林氏消化液 (简称消化液), 氨基氮 (AN) 0.14, 酵母浸膏 3, 磷酸氢二钠 0.08, 乳酸 0.25, 20% 氯化钙溶液 0.4。用 20% 氢氧化钠溶液调 pH 至 8.2~8.4, 加 II 号溶液 (生长因子: 尼克酸、 $\beta$ -丙氨酸、庚二酸) 0.2ml。供菌株传代用, 装量为 6ml / 支中试管。供菌株产毒用, 装量为 100ml / 克氏瓶。112℃ 灭菌 20min。

**1.2.2 分离培养基**: 菌种培养基调 pH 至 7.0~7.5, 加入 1.5% 的琼脂粉加热溶化, 调 pH 8.0~8.2, 抽气过滤后, 加 2% II 号溶液, 以 112℃ 灭菌 20min。待温度降至 50~60℃, 加 10% 脱纤维兔血, 75℃ 加热 5min, 冷却至 50~60℃ 制成平板, 放入 35℃ 培养 2~3d, 检查如果没有染菌, 放入 2~8℃ 冰箱备用。

**1.2.3 两种菌株保存培养基 (简称吕氏血清斜面)**:

配方 I: 一份 pH6.0 菌种培养基, 三份健康马血清, 加 1% 的 30% 麦芽糖水溶液, 摇匀分装中试管, 放凝固器内 85℃ 加热 1h, 制成斜面备用。

配方 II: 一份普通肉汤 (1:2 牛肉浸液, 1% 蛋白胨, 0.5% NaCl), 三份健康马血清, 加 1% 的 30% 麦芽糖水溶液, 摇匀分装至中试管, 放凝固器升温 80~90℃ 至凝固, 然后 80~90℃ 75min 间歇灭菌两次, 制成斜面备用。

### 1.3 从白喉棒状杆菌筛选高产毒株

**1.3.1 不同批消化液产毒单位的比较**: 启开 871-2-1 菌株, 选用大罐生产产毒单位较高的 89-5 消化液制备培养基作产毒试验对照, 与 1993 年 4 批新消化液制备的培养基进行产毒试验比较。

**1.3.2 在两种吕氏血清斜面上白喉棒状杆菌产毒单位的比较**: 启开 871-2-1 菌株, 用 93-1 批消化液制备的培养基传 2~3 代, 再用两种吕氏血清斜面传代后比较产毒单位。

**1.3.3 筛选产毒单位高的次代菌株**: 由 871-2-1 菌株接种至中试管培养基内, 传 2~3 代后接种至克氏瓶培养基内, 加适量的麦芽糖稀 (其中麦芽糖约含 70%, 葡萄糖约含 30%), 33~35℃ 培养 6d, 测定产毒单

位。从2~3代中试管菌液传至吕氏血清 33~35℃ 培养 16~18h, 从吕氏血清斜面上的菌膜传入中试管培养基, 33~35℃ 培养 16~18h。然后从吕氏血清斜面传代的中试管培养的菌液接种克氏瓶 33~35℃ 培养 6d, 测定产毒单位。同时用中试管菌液稀释后接种平板, 于 33~35℃ 培养 48h, 在显微镜下观察。从平板挑选小而光滑的乳白色菌落, 取一半菌落接种至中试管培养基内, 另一半菌落接种于吕氏血清斜面培养 16~18h(为保留菌落)。然后从接种一半菌落的中试管菌液内取菌膜接种于克氏瓶内, 33~35℃ 培养 6d, 测定产毒单位。挑产毒高的菌落从吕氏血清斜面的保留菌落继续传代, 进行下一轮筛选。

2 结果

2.1 5批消化液制备的培养基用于产毒的比较

选用5批消化液制备的培养基及871-2-1菌株, 加适量麦芽糖稀培养后, 89-5消化液制备的培养基产毒单位 160Lf / ml(因 89-5消化液是用作对照, 正式筛选菌株使用 93-1批消化液), 5批消化液产毒结果见表 1。

表1 5批消化液制备的培养基产毒单位比较

消化液		菌株号	培养基含糖量 (g/L)		产毒单位 (Lf/ml)
消化液批号	AN/ml				
			麦芽糖	葡萄糖	
89-5	3.40	871-2-1	9.87	4.5	160
93-1	3.55	871-2-1	9.87	4.5	150
93-2	3.59	871-2-1	9.87	4.5	110
93-3	3.24	871-2-1	9.87	4.5	110
93-4	3.41	871-2-1	9.87	4.5	130

表 1 结果表明, 93-1批消化液制备的培养基产毒单位比 89-5批消化液制备的培养基产毒单位低 10Lf / ml, 正式筛选菌株选用 93-1批消化液制备培养基, 其余 4 批未选用。

2.2 在两种吕氏血清斜面上白喉棒状杆菌产毒单位比较

两种配方的吕氏血清斜面用作保存菌株的培养基, 871-2-1菌株, 经 93-1批消化液制备的培养基传代, 在吕氏血清斜面保存后产毒结果见表 2。

表 2 结果表明, 配方 II 的产毒单位高于配方 I, 以配方 II 作为菌株保存培养基是保存传代菌株的较好配方。

2.3 单个菌落分离筛选结果

选用 93-1批消化液制备的菌种培养基, 配方 II 制备的吕氏血清斜面为筛选菌株的条件。从原始菌株 871-2-1号(产毒 160Lf / ml)开始, 每轮挑选 20 个菌落, 于 20 个菌落中挑 2 个产毒单位较高的菌号, 作为下轮培养传代菌株, 结果见表 3。

表 3 结果可见, 第一轮挑选的菌落产毒单位最低是 150Lf/ml, 最高产毒单位是 230Lf/ml, 产毒单位高的菌落比原来菌株高 70Lf/ml。第二轮、三轮的产毒增加不明显, 可能没有挑选出产毒水平较好的菌株。到第四轮产毒单位有所提高, 最高达到 288Lf/ml, 但最低产毒单位只在 210Lf/ml。到第六轮挑选出产毒单位高于原菌株 79% 的菌株。

2.4 菌株冻干前后产毒单位的比较

在第六轮挑选出的 4 号、6 号菌株, 在吕氏血清斜面传二代, 菌膜溶解至少量脱脂牛奶中, 进行冻干, 结果见表 4。

表2 在两种吕氏血清斜面上白喉杆菌产毒单位的比较

吕氏血清斜面	菌株号	消化液批号	产毒单位 (Lf/ml)
配方I	871-2-1	93-1	150
配方II	871-2-1	93-1	160

表3 菌株筛选不同轮次产毒单位比较

轮数	菌落数	菌落号	产毒单位 (Lf/ml)			
一	20	1, 2, 5, 10	150	160	230	230
二	20	1, 3, 4, 7	170	170	240	240
三	20	1, 2, 7, 8	210	210	240	230
四	20	4, 5, 3, 10	230	210	288	280
五	20	1, 4, 2, 5	259	259	280	280
六	20	1, 3, 6, 4	259	259	287	280

表4 菌株冻干前后产毒单位比较

菌株号	表面培养		大罐培养产毒单位分布		平均产毒单位 (Lf/ml)
	冻干前	冻干后	罐数	产毒单位 (Lf/ml)	
93-1-4	280	280	3	252~432	312
93-1-6	287	290	20	312~460	388

从冻干结果看出,冻干前后产毒单位变化不明显,说明冻干条件较好,是保存菌株的良好方法。

### 3 讨论

本实验筛选菌株的方法,是参考长春生物制品研究所筛选菌株的一些方法,结合本所多年实际工作经验,进行了几批消化液和两种吕氏血清斜面比较,选用了比较适合的条件,进行了六轮挑选,从160Lf/ml开始至287Lf/ml结束。在1994~1996年大罐生产中采用93-1-6菌株产毒单位平均达到388Lf/ml,比1993年平均单位296Lf/ml提高了31%。从表面培养和深层培养的结果分析,同一批号的菌株每次产毒力差别较大,可能与培养基的营养成分及培养过程中的温度、通气量、pH值等有关。本实验筛选的菌株用于1994~1996年生产白喉类毒素制品中,制品的免疫原性较好,安全、效力试验都符合国家生物制品规程要求<sup>[2]</sup>。根据多年经验冻干后的菌株如果保存条件不适当,当产毒低的变异株占了优势时,几年后可能引起产毒下降。所以菌株在长期保存过程中要进行不断的筛选工作。据leong等(1983)<sup>[3]</sup>报道,利用基因工程技术,将抗原决定簇编码部分克隆在大肠杆菌内,产生具有免疫原性的产物,这样有可能应用到产生白喉毒素的过程中,对筛选白喉菌株带来新的前景。

### 参 考 文 献

- [1] 阙毓筠. 白喉类毒素. 见: 卢锦汉等主编. 医学生物制品学. 北京: 人民卫生出版社, 1995. 715~729.
- [2] 卫生部生物制品标准化委员会编. 中国生物制品规程(一部). 北京: 中国人口出版社, 1996. 151.
- [3] Leong D, Coleman K D, Murphy J R. *Science*, 1983, 220: 515~517.

## STRAIN OF SCREEING HIGH TOXIN——PRODUCING FROM *CORYNEBACTERIUM DIPHTHERIA* PW8-WEISSENSEE

Rong Fensheng    Xue Yuzhen    Sun Jingzhi

(National Vaccine and Serum Institute Beijing, Bingjing 100024)

**Abstract** *Corynebacterium diphtheria* PW8-weissensee was grown on different media for screening high toxin produce. Through six times of screening (selecting butyrous brilliant smooth small colonies and testing their toxin production capacity) from original strain producing toxin 160Lf / ml, a high toxin——producing descendand culture was obtained, which produced 79% more toxin than the original strain did.

**Key words** *Corynebacteria diphtheria*, Strain, Media