

高效单价特异抗 A 型肉毒兔血清的制备

马清物 林台城 罗清华 马翠娥

(中国人民解放军 89943 部队)

目前关于纯的肉毒类毒素及其抗血清的制备研究较少。纯抗原及纯抗血清不仅对肉毒毒素结构和功能的研究起重要作用,而且对于提高类毒素的免疫效果与抗毒素的治疗效果;减少异质反应;和应用纯抗血清提高体外血清学诊断方法的精确性等方面都有重要作用。我们对高效单价特异抗肉毒血清的制备进行了研究,其结果表明,采用纯毒素进行脱毒,再将类毒素进一步纯化后免疫家兔,可以获得较满意的结果。

材料与方 法

一、材料

(一) 毒素

1. 粗制 A 型和 B 型肉毒毒素: 将 A 型 61A 01—188 菌株和 B 型 61 B01 及 61 B02 菌株分别接种在 5% 玉米浆、3‰ 奶粉、1.5% 葡萄糖培养基中。取其第五天的培养液,即为粗

制 A 型和 B 型肉毒毒素。

2. 纯 A 型肉毒毒素: 将粗制 A 型肉毒毒素放在 pH 4.0 0.5% CaCl_2 中,絮沉除去杂质,上清液中加入 1.5% 的六偏磷酸钠,在 pH 3.5 条件下进行沉淀,以 pH 6.5 磷酸缓冲液提取,然后经蔡氏滤器除菌,对水透析,将毒素沉淀物提取后再以 pH 8.0 0.15 M Tris-HCl 缓冲液进行两次 DEAE——纤维素分段层析,提纯约 4,000 倍,毒力在 $2 \times 10^7 \text{ LD}_{50}$ /毫升以上,纯度为 $10 \times 10^8 \text{ LD}_{50}$ /毫克氮,琼脂扩散试验中,对粗制抗 A 型肉毒马血清显示出一条沉淀线,对粗制抗 B 型肉毒马血清则不显示。

(二) 抗血清

1. 粗制抗 A 型肉毒马血清: 经硫酸铵纯化后的制品,对粗制 A 型毒素可显出五条沉淀线。由兰州生物制品研究所供给。

2. 粗制抗 B 型肉毒马血清: 对粗制 A 型毒素起交叉反应,可显示五条以上沉淀线。由兰州生物制品研究所供给。

(三) 试剂

葡聚糖凝胶 G-200。由瑞典进口。

(四) 试验动物

家兔体重 1.5—2.5 公斤,雌雄均可。

二、方法

1. 抗原的脱毒: 于纯的 A 型毒素中加入福尔马林溶液,最终浓度为 1.0—1.5% (V/V), 于 37℃ 温箱中培养。40 天后给小鼠腹腔注入脱毒毒素 0.5 毫升, 小鼠活存, 表明毒素脱毒完全。

2. 类毒素的纯化: 用葡聚糖凝胶 G-200 过滤纯化, 层析柱为 2.5 × 70—80 (厘米), 以 pH 7.5 0.05 M Tris-HCl 缓冲液洗脱, 分别测定各洗脱峰的样品效价, 并进行琼脂双扩散试验鉴定其纯度。

3. 类毒素的免疫血清效价测定: 按生物制品常规方法进行。

4. 琼脂双扩散试验: 琼脂浓度 1.5%, 池距 1.2 厘米, 每池加样 0.3 至 0.4 毫升, 于室温放置三至五天, 观察结果。

试验结果

一、纯类毒素的制备及纯度鉴定

纯毒素*经福尔马林脱毒后, 进行凝胶过滤层析, 制备成纯类毒素。经脱毒后制备的类毒素, 成份不均一, 经凝胶过滤后, 类毒素被分离在两个洗脱峰 (I、II 峰) 中。I 峰为特异的纯抗原, 在琼脂扩散试验中, 对 A 型抗血清仅形成一条沉淀线, 对 B 型抗血清不形成沉淀线 (图 1)。

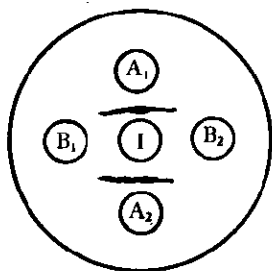


图 1 纯肉毒 A 型类毒素的琼脂双扩散试验 (A₁ 为抗 A 马血清, A₂ 为抗 A 兔血清, B₁ 为抗 B 马血清, B₂ 为抗 B 兔血清。I 示过滤后的 I 峰)

II 峰为非特异性蛋白, 对 A 型抗血清不形成沉淀线 (图 2)。

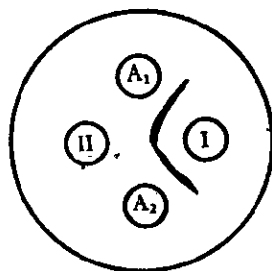


图 2 I、II 峰抗原琼脂双扩散试验 (I、II 代表过滤后的 I 峰和 II 峰, A₁ 代表抗 A 马血清, A₂ 代表抗 A 兔血清)

二、纯抗原免疫方案的比较

为了获得纯的特异抗血清, 选用合理的纯抗原免疫方案是很重要的。我们用以下三个免疫方案进行了试验比较。

(一) 一针多点免疫方案

将纯抗原加完全弗氏 (Freund) 佐剂 (抗原与佐剂之比为 1:3), 于家兔背部皮下 10 个点处分别接种 0.5 或 1.0 毫克蛋白抗原, 2 个月后放血, 测定抗体效价及鉴定纯度 (见表 1)。

表 1 一次免疫后抗体滴度及其纯度分析

兔 号	免疫剂量 (毫克蛋白)	抗体滴度 (单位/ 毫升)	抗体纯度分析	
			A	B
1	1.0	600	1	0
2		200	1	0
3		100	1	0
4		300	1	0
5	0.5	100	1	0
6		50	1	0
7		600	1	0
8		400	1	0

结果由表 1 表明, 8 只家兔中, 不管免疫剂量是 0.5 还是 1.0 毫克蛋白, 一次免疫接种后, 血清抗体滴度低的为 50 至 100 单位/毫升, 高的可达 600 单位/毫升, 显示了动物的个体差异

* 此纯毒素含 10×10^8 LD₅₀/毫克氮, 于 280 毫微米光密度为 3.0 的浓度下, 琼脂双扩散试验对于 A 型抗血清显示一条沉淀线, 对 B 型抗血清不出现沉淀线。

较大。经抗血清纯度分析,在琼脂双扩散试验中,对A型类毒素出现一条沉淀线,对B型类毒素不出现沉淀线,显示出特异的抗A纯血清。

两只家兔血清抗体滴度的消长情况(见图3)表明,一次免疫接种后3周,家兔血清中抗体滴度达50至100单位/毫升,以后不断增长,至7周时达高峰(400—800单位/毫升),随后下降。由此说明,要获得高滴度的血清抗体,在免疫接种后7—8周左右采血为宜。

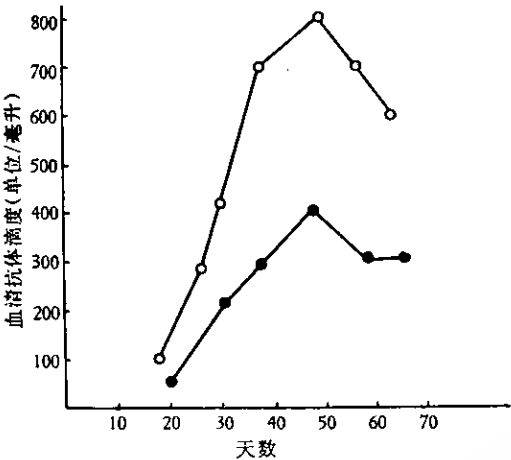


图3 一次免疫后抗血清滴度的消长曲线

此外,家兔血清抗体在一次免疫后6周或8周再予以加强免疫接种,其效果可从表2看出。加强免疫后10天,六只家兔中的血清抗体滴度除一只为每毫升600单位外,均在每毫升2,500单位以上,约比未加强免疫时提高12—15倍。说明加强免疫能显著提高血清抗体的滴度。同时加强免疫还可使部分家兔的抗血清在琼脂双扩散试验中,对A型毒素出现二条沉淀线。

表2 一次免疫后加强免疫的效果

兔 号	加强免疫间隔(周)	抗血清滴度(单位/毫升)		抗血清纯度分析	
		加强免疫前	加强免疫后	A	B
1	6	—	2,500	1	0
2		—	600	1	0
3	8	200	2,500	1	0
4		200	6,000	1	0
5		100	5,500	1	0
6		200	5,000	2	0

(二) 三针免疫方案

将125单位/毫升纯类毒素加不完全弗氏佐剂,分别在0、20、40天对家兔进行皮下接种,于首次接种后20天和第二、三次接种后一周,分别采心血测定抗体滴度,并做琼脂双扩散试验,分析抗体纯度。结果从表3、图4可见,一次接种后血清抗体滴度较低,为10—20单位/毫升,第二次接种后增长约20倍,第三次接种后抗体滴度达300—500单位/毫升,琼脂双扩散试验中,对A型毒素呈现一条沉淀线,表明抗血清是纯的。

表3 0、20、40天三次免疫方案的免疫效果

兔 号	各次接种后的抗体滴度(单位/毫升)		
	1	2	3
1	12	200	500
2	10	200	300

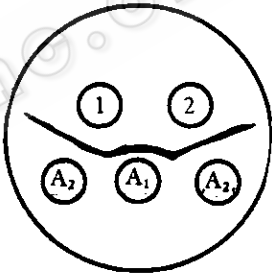


图4 三次免疫后抗血清的琼脂双扩散试验 (1,2代表兔血清, A₁为粗制A型毒素, A₂为纯A型毒素)

(三) 八针免疫方案

对30只家兔进行八针臀部肌肉注射,每次接种类毒素100单位/毫升,前三针每针间隔三天,后五针加不完全弗氏佐剂,每针间隔七天。八针注射完毕后10—20天,抽心血测定抗体滴度和分析纯度,结果从表4看出,30只家兔抗体滴度均达到2,000—4,000单位/毫升。其中22只家兔抗血清在琼脂双扩散试验中仅与A型

表4 家兔8针免疫后抗血清滴度及其纯度分析

动物数(只)	抗体纯度分析		抗血清滴度(单位/毫升)
	A	B	
22	1	0	2,000—4,000
1	1	1	2,000—4,000
3	2	0	2,000—4,000
4	2	1	2,000—4,000

毒素出现一条沉淀线,与B型毒素不出现沉淀线,表示达到了单价特异抗血清纯度指标。

讨 论

据国外报道^[1-3],制备A型毒素单价特异抗血清,所用方法都是从结晶毒素纯化后制备纯抗原免疫动物而获得的。

在我们的试验中,采用单价特异纯毒素经福尔马林脱毒制备成类毒素,然后再经葡聚糖凝胶G-200过滤,进一步纯化,用这个制剂免疫动物,能获得A型单价特异抗血清。纯度分析结果表明,于琼脂双扩散试验中,对A型毒素显示一条沉淀线,对B型毒素不出现沉淀线。其滴度一般可达100—600单位/毫升,高者可达5,000单位/毫升以上,效果是好的。

在我们的试验中,用一针大剂量类毒素的免疫方案,和小剂量多次免疫方案相比较,虽然都能获得单价特异抗血清,但前者用的时间短,对保证抗体纯度也有一定好处。而多次免疫容易刺激非特异抗体的产生。因此我们认为采用一针大剂量类毒素多点免疫的方案是比较理想的。抗原剂量方面,以应用1.0毫克总蛋白抗原(约相当于6,000单位/毫升),于接种后7—8周采血合适。必要时可于接种二个月后给予加强免疫,以提高血清中抗体滴度。

参 考 文 献

- [1] Miller, C. A. and A. W. Anderson: *Inf. Immunity*, 4(2): 126—129, 1971.
- [2] Boroff, D. A. and G. Shu-chen: *Appl. Microbiol.*, 25: 545—549, 1973.
- [3] Sugiyama, H. et al.: *Appl. Microbiol.*, 27: 333—336, 1974.