

白喉杆菌高产毒株的筛选

肖锡岭 吴新兰 石宜令 李家武 王淑嫻

(卫生部长春生物制品研究所 长春)

白喉杆菌 PW8 株是各国通用的制造白喉毒素的菌株,具有较高的自然变异性,一些作者^[1-3]曾从该株分离培养出产毒能力较高的次代菌株。为了获得产毒能力更高的菌株,我们用逐步单颗集落筛选法,从白喉杆菌 PW8-

Weissensee 菌株中分离筛选出一株产毒较原株高 47.25% 的次代菌株。现将结果报道如下。

本文承 杨凤文、周景中教授审阅,本工作得到王扶生、李惠发主任支持,在统计方法方面得到刘垂玕老师的帮助,一并表示感谢。

材料和方法

一、菌种

白喉杆菌 PW8-Weissensee 株, 来自罗马尼亚。

二、培养基

1. 基础培养基: Pope 氏培养基^[4], 即牛肉胰酶消化液经加适量氯化钙除铁制成的培养基, 铁含量为 0.05—0.1r/ml, 氨基氮含量为 1.1—1.3mg/ml, 加适量 Mueller 氏生长因子溶液即可。

2. 分离培养基: 是我们改进的一种巧克力平板, 即 2% 的琼脂 Pope 氏培养基, 溶化后冷至 80℃ 加 10% 的脱纤维兔血, 加(或不加) 1% 亚碲酸钾溶液至 0.02%, 75℃ 加热 10 分钟制成平板, 温室烘干备用。

3. 产毒培养基: Pope 氏培养基, 接种前加适量糖稀(自制粗麦芽糖溶液)。

4. 液体传代培养基: 中管装 Pope 氏培养基。

5. 菌种保存培养基: 是我们改进的一种血清凝固斜面, 即三份健康马血清加一份 pH6.0

的 Pope 氏培养基, 加 0.3% 的麦芽糖, 摇匀, 85℃ 加热一小时制成斜面备用。

三、方法

1. 产毒试验: 液体种子菌膜接种到克氏并装 250 ml Pope 氏培养基中, 34℃ 静止培养 6 天, 取出测 Lf/ml 和 pH₀。

2. 菌种分离筛选法: 用逐步单颗集落筛选法, 如下所示。

出发菌株→巧克力平板涂布, 34℃ 培养 2—3 天→单颗集落分离→液体传代培养基, 34℃ 培养 18 至 24 小时, 共二代

血清斜面, 34℃ 培养 24 小时→冰室保存。(产毒优良者待下步分离筛选用。)

接种到克氏并装 Pope 氏培养基中, 34℃ 培养 6 天, 取出测 Lf/ml 和 pH₀。

试验结果

一、单颗集落分离筛选结果

由出发菌株开始, 经三轮分离筛选, 获得了三株产毒稳定的菌株, 即 Weissensee → W53 → W93 → W115。

此 4 株菌株的子代集落株的产量(以 Lf/ml 表示, 下同)分布见表 1。

表 1 4 株菌株的子代集落株的产量分布

菌株名称		产量 Lf/ml		子代集落株数																				计	出发株产量 Lf/ml
		100	120	i	1	110	130	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240	250	260	270	280			
Weissensee		5	4	15	17	4	7																	52	150
W53						2	31	40	11	10	10	8	7	2										121	175
W93						1	2	1	17	12	20	20	5	7	5	3	0	0	1					94	210
W115									6	8	15	17	20	23	13	19	12	11	1					145	230

根据刘垂珩^[5]的公式及统计学原理, 按照公式 $A = \bar{x} \left(\frac{C_t}{6} \right)^{1/6} \left(1 - \frac{G_1}{8} \right)^{1/2}$ 分别计算上述 4 株菌株的子代集落株产量分布的参数, 见表 2。

从表 1、2 可见, 1. 由 Weissensee 株逐步分离出来的 W53 株、W93 株和 W115 株, 它们分别较相应的出发菌株提高产势 16.45% (25.3486Lf/ml)、17.20% (30.8743Lf/ml) 和

16.60% (34.9306Lf/ml), W115 株较 Weissensee 株提高产势 59.16% (91.1535Lf/ml)。2. 各集落株的产毒平均值皆与其相应的出发菌株产毒水平相近。说明出发菌株的产毒水平影响着其子代集落株的产毒水平, 而出发菌株的产毒水平, 实际上是变异了的产毒能力不等的后代群体的反映。

二、分离培养基成分对 PW8-W115 株的分发效果影响

表2 4菌株的子代集落株产量分布的参数

	Weissen- see	W53	W93	W115
集落株产毒平均值 \bar{x}	145.5714	178.6776	203.4042	228.2758
标准差 S	18.4550	19.6613	22.1700	24.9261
变异系数 V	12.8842	11.0037	10.8994	10.9192
稳度 C_t	7.7795	9.0877	9.1747	9.1581
偏度 G_t	-0.4504	0.9748	0.5766	-0.0192
产势 A	154.0854	179.4340	210.3082	245.2389
%	100.00	116.45	136.49	159.16

注 $C_t = \bar{x}/S$, 产量分布的稳度。A 称菌株的产势, A 值愈大, 说明菌株愈优。一个菌株的子代产量分布称为该菌株产量分布^[1]。产量即单位产量(如 Lf/ml)或与出发株相比的百分产量(如 80%)。

表3 W115 株的子代集落株的产量分布

分离培养基成分	产量 (Lf/ml)												
	子代集落株数												
不加亚硝酸钾	10	18	17	23	28	46	23	24	21	16	11	5	2
加亚硝酸钾	20	30	24	28	11	13	9	8	8	4	2	1	

表4 W115 株的子代集落株产量分布的参数

统计项目	不加亚硝酸钾	加 0.02% 亚硝酸钾
产毒平均值 \bar{x}	232.0491	212.4050
标准差 S	28.0926	26.3835
稳度的倒数 C_t^{-1}	0.1210	0.1242
偏度 G_t	0.1318	0.8357
变势 B	218.1710	191.3899
%	113.99	100.00

注 B 称变势, 变势愈大, 分离发散效果愈好, 即正变的幅度愈大。

杆菌 PW8 株的单颗集落分离发散效果也有不利影响。这可能是由于亚硝酸钾对白喉杆菌的抑制作用^[6], 特别是对生长慢而产毒高的子代集落株的抑制作用的结果。

三、生产使用结果

W115 株与 Weissensee 株用深层大罐(300—500 立升)培养进行工业生产, 其产毒结果见表 5。

从表 5 可见, 用深层大罐培养, W115 株产

涂布 W115 株在加和不加亚硝酸钾分离培养基上, 培养后进行单颗集落分离, 其子代集落株的产量分布见表 3。

按照公式 $B = (6C_t^{-1})^{1/6} \left(1 - \frac{G_t}{8}\right)^{1/2}$, 分别计算其产量分布的参数, 见表 4。

从表 4 可见, 在不加亚硝酸钾分离培养基上分离的 W115 株的子代集落株产量分布的变势比加亚硝酸钾分离培养基分离的子代集落株高 13.99% (26.7811Lf/ml)。t 检验结果 ($t = 3.5032$) 表明两者的差异是非常显著的。说明亚硝酸钾虽对其他杂菌有抑制作用, 但对白喉

表5 W115 株与 Weissensee 株生产使用结果*

	W115 株	Weissensee 株
产毒 (Lf/ml) 范围	380—680	260—410
生产罐数 n	33	38
产毒平均值 \bar{x}	508.7878	345.5263
标准差 S	74.0252	38.1814
$t = 11.9023$		$P_{0.001(70)} = 3.435$

* 其中有兄弟所部分结果

毒为 380—680Lf/ml, 平均 508.8 Lf/ml, Weissensee 株产毒为 260—410Lf/ml, 平均为 345.5 Lf/ml, 前者较后者高 163.26 Lf/ml, 提高 47.25%。t 检验证明此差异是非常显著的。

另外, 将 W115 株深层培养在高氮 (1.7—1.8 mgAN/ml) 培养基上, 产毒可达 700—800 Lf/ml, 远远超过国外 210—400Lf/ml 的水平。

讨 论

1. 通过三轮单颗集落筛选, 白喉杆菌 PW8—Weissensee 株可逐步提高产势 16.45%、17.20% 和 16.60%。F 值及 q 值检验证明这种

差异是非常显著的,说明通过逐步分离筛选致使菌株产毒能力不断提高并非来自环境或误差,而是来自白喉杆菌产毒能力发生了可遗传的变异。

上述菌株的子代集落株的产毒能力差异亦很大,它们分别为 70、80、130 和 130Lf/ml。子代集落株产毒能力的较大差别,部分原因是来自环境,如培养基培养条件的影响等,但主要原因是来自细菌的变异,这是通过分离筛选获得高产毒株的基础。这种数量上的变异称之为较小突变。

2. 西村武^[3]认为通过 4 轮分离筛选,白喉杆菌 PW8 株即可达到纯的地步。然而从材料来看,即使 W115 株,其子代集落株的产毒能力差别仍很大,其变异系数和 W53、W93 株的并没有多大差别。白喉杆菌 PW8 株产毒能力的变异是经常的,“纯”是难以达到的。因此不断地进行高产毒株的筛选是无止境的工作。

3. 本文说明: 刘垂珩的公式

$$A = \bar{x} \left(\frac{C_t}{6} \right)^{1/6} \left(1 + \frac{G_1}{8} \right)^{1/2},$$

认为 A 应与 \bar{x} 、 C_t 及 G_1 成正变关系。但统计学原理认为, G_1 负值说明平均值以上的数值过多(从统计表中可看出),即正变幅度大, G_1 正值说明平均值以下的数值过多,即负变幅度大。故 A 应与 \bar{x} 、 C_t 及 $-G_1$ 成正变关系。因此该公式可修改为

$$A = \bar{x} \left(\frac{C_t}{6} \right)^{1/6} \left(1 - \frac{G_1}{8} \right)^{1/2}.$$

参 考 文 献

- [1] Yoneda, M.: *Br. J. Exp. Path.* **38**: 190, 1957.
- [2] Miller, P. A.: *J. Gen. Microb.* **46**: 43, 1967.
- [3] 西村武: 日本细菌学杂志, **140**: 883, 1959.
- [4] WHO "Manual" Diphtheria Toxoid, pp 44, 1977.
- [5] 刘垂珩: 微生物学报, **2**: 166, 1980.
- [6] Шкет. B. A.: *Лаб. Дело*, **8**: 461, 1980.