

加热霍乱类毒素的制备及其抗原性的研究

曲振海 郝兴芝 周荷美

余雪轩 李焕娣 倪斌

(微生物学教研室)

(南京医学院微生物学教研室)

提 要 粗制霍乱肠毒素经60℃水浴, 5分钟后其毒性丧失99%, 抗原结合性保留87.5%。PAGE显示: 毒素已成为大分子聚合物。将这种聚合物经口免疫小鼠, 产生良好的肠道抗毒免疫和一定程度的血清抗体反应。

关键词 霍乱肠毒素; 类毒素; 抗原性; 小鼠

在霍乱免疫中, 抗毒免疫占有重要位置。有效的刺激机体的抗毒免疫, 对霍乱的防治具有重要意义。已知霍乱毒素(CT)是一种强烈的肠道免疫原。但CT在刺激机体免疫的同时, 也引起腹泻⁽¹⁾。为了寻找一种安全, 有效的类毒素抗原, 我们将CT经加热处理, 得到一种类毒素, 并对其在动物体内的抗原性和免疫保护作用进行研究, 现将结果报道如下。

材料和方法

一、实验菌种: 569B: 霍乱弧菌稻叶型。由上海生物制品研究所提供。

二、实验动物: C₅₇BL/6j纯系小鼠, 7~9周龄, 同性别。白毛豚鼠, 400克左右, 雌性。由江苏省实验动物中心提供。

三、霍乱类毒素的制备

1. 粗霍乱毒素(CrT)的提取: 取霍乱弧菌产毒菌株569B新鲜培养物20ml种入180ml产毒培养基, 震荡培养, 270rpm, 30℃, 24小时。培养结束, 立即通过纸板, 微孔滤膜(直径0.45μm), 除去菌体, 然后超滤, 分别通过PM₁, PM₁₀膜, 除去滤液中分子量在1万以下, 10万以上的物质, 浓缩得CrT。

2. CrT的脱毒: 以0.1N NaOH调CrT

pH至8.0, 置60℃水浴, 不同时间。得加热霍乱类毒素。

四、加热霍乱类毒素的鉴定方法

1. 聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE); 按常规法操作。

2. CrT毒性测定: 按照Crag的方法⁽²⁾。

3. CrT抗原结合性测定: 按照陈慎宝的方法⁽³⁾。

五、免疫方法

1. 以0.05M, pH7.4PBS(内含0.02%明胶)稀释霍乱类毒素, 与10%NaHCO₃等量混合、经口灌入小鼠, 0.5ml/鼠, 免疫程序: 0、10、15天; 剂量: 14μg、7μg、7μg。末次免疫后5天测全身和肠道免疫力。对照组以10%NaHCO₃代替霍乱类毒素。

2. CrT免疫程序, 剂量同霍乱类毒素。

3. 常规霍乱菌苗(25亿)与10%NaHCO₃等量混合, 经口灌入小鼠, 免疫程序同类毒素。

六、霍乱类毒素免疫效果的评价指标

1. 肠道免疫力测定: 肠环结扎试验。按照Lange的方法⁽⁴⁾。末次免疫后5天小鼠, 剖腹, 结扎一段小肠约8cm, 注入0.2

ml CT (2 μg), 6 小时后计算肠环积液率 (肠环重量mg/肠环长度Cm), 判定肠道抗毒免疫。结扎肠环内注入0.2ml霍乱弧菌 (1.25×10^8 CFU), 16 小时后计算肠环积液率, 判定肠道抗菌免疫。

2. 血清抗体测定

(1) 抗毒抗体测定: ELISA 抑制法。按照陈慎宝⁽³⁾的方法加以改进。5 μg/ml 羊抗CT IgG包板, 冲洗后加 1%FCS 封闭; 加CT-被检小鼠血清混合液 (以 1LB/mlCT 与不同稀释度小鼠血清混合, 37°C, 1 小时); 加羊抗CT-酶结合物; 加OPD显色; 2 M硫酸终止反应。DG-III型酶标仪测 OD 值。以正常小鼠血清为阴性对照, 以 1 单位标准抗毒素 (中国药品生物制品检定所提供) 为阳性对照。

(2) 杀弧菌抗体测定: 按照鲍行豪的方法⁽⁵⁾。

(3) 凝集抗体测定: 按照Kabir的方法⁽⁶⁾。

七、统计方法

肠环积液率以算术均数表示, 血清抗体水平以几何均数表示, 均采用单因素方差分析。

结 果

一、CrT经加热变成霍乱类毒素过程中电泳、毒力及抗原结合性的变化

1. PAGE图谱: CrT经60°C水浴 5 分钟, 电泳图谱发生明显变化, 其迁移率小于未加热CrT, 以后继续加热电泳谱基本相似。(图1)

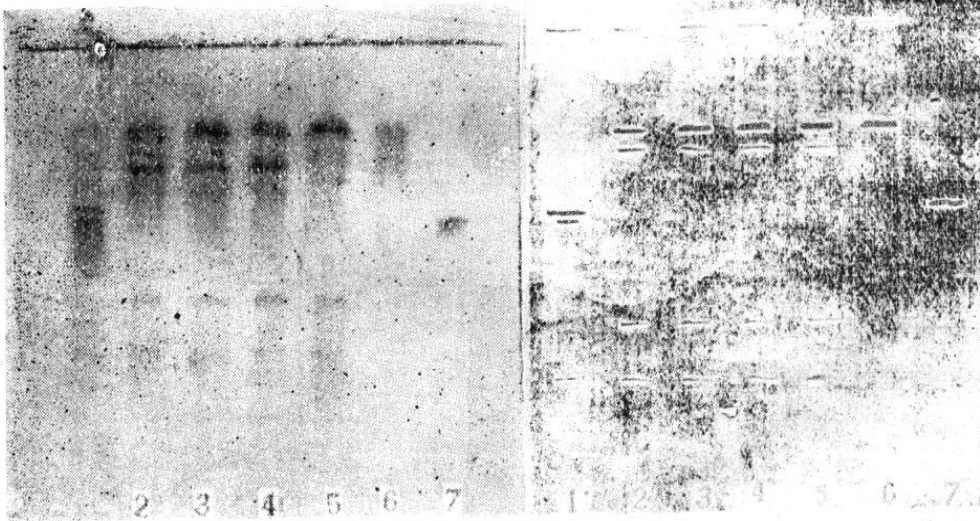


图1 CrT60°C水浴不同时间的PAGE图谱 (示意图)

1. CrT; 2. 5分钟; 3. 10分钟; 4. 20分钟; 5. 30分钟; 6. 纯化CT, 30分钟; 7. 纯化CT

2. 类毒素的残留毒性: CrT经水浴 5 分钟, 毒性丧失约99%, 10分钟后毒性几乎全部丧失。见图2。

3. 类毒素的抗原结合性: 从图3可见到, CrT水浴 5 分钟后, 抗原结合性保留约 87.5%, 30分钟仍保留56.3%。

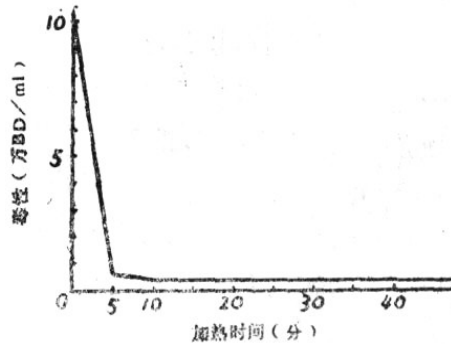


图2 CrT经加热后的毒性变化

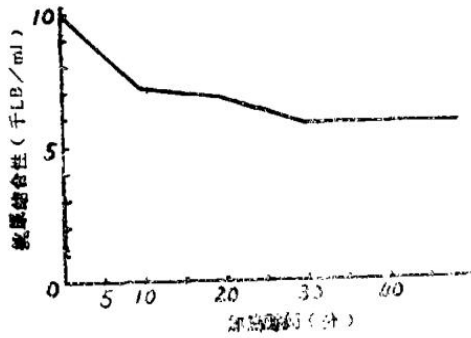


图3 CrT经加热后抗原结合性的变化

二、霍乱类毒素对小鼠的抗原性和免疫保护作用

1. 肠道免疫保护作用：以CT和有毒力的霍乱弧菌分别攻击免疫小鼠的结扎肠环，结果表明(表1)：类毒素和CrT免疫组小鼠肠环无明显积液，与PBS对照组相似($P>0.05$)；霍乱菌苗免疫组小鼠肠环出现积液，与类毒素免疫组相比，差异有非常显著性($P<0.01$)。

表1 免疫小鼠的肠环积液率

抗原	剂量	免疫途径	肠环积液率(肠环重量mg/肠环长度cm)		
			CT	VC	PBS
类毒素	14 μ g	P.O	78	67	72
CrT	14 μ g	P.O	80	54	68
菌苗	25亿	P.O	179	114	65
NaHCO ₃	0.5ml	P.O	150	109	70

CT：霍乱毒素；VC：霍乱弧菌。

2. 血清抗体水平：类毒素经口免疫后，小鼠血清中产生一定滴度抗毒抗体，未产生杀弧菌抗体和凝集抗体。菌苗免疫组产生一定滴度杀弧菌抗体(表2)。

讨 论

1985年WHO公报⁽⁷⁾指出：迄今为止，霍乱肠毒素是霍乱弧菌唯一明确的保护性抗原。它能在多种动物引起较强的粘膜抗毒反应，在霍乱免疫中起重要作用。但霍乱毒素

表2 免疫鼠血清抗体水平

抗原	剂量	免疫途径	抗毒素 μ /ml	抗体水平	
				杀弧菌	凝集
类毒素	14 μ g	p.o	58	<1:5	<1:2
CrT	14 μ g	p.o	60	<1:5	<1:2
菌苗	25亿	p.o	<2	1:93	1:3
NaHCO ₃	0.5ml	p.o	<2	<1:5	<1:2

在刺激免疫的同时，也引起腹泻。显然用毒素作为疫苗是不合适的。以后人们用多种方法使毒素脱毒成为类毒素。但经现场考核，甲醛固定的类毒素不稳定，易恢复毒性；戊二醛固定的类毒素免疫效果较差⁽⁸⁾。近来国外有人用毒素的B亚单位和霍乱全菌体合用，获得了较佳的肠道免疫保护⁽⁹⁾。但目前在我国大面积使用B亚单位尚有一定困难。

为了寻找一种安全有效的类毒素抗原，我们将霍乱弧菌培养液经超滤浓缩后作为CrT。经PAGE证实，CrT中主要蛋白带与标准CT带相同。CrT中含有较高的毒素活性。经60℃水浴5分钟后，CrT开始聚合成大分子的类毒素，其毒性随之消失，保留大部分抗原结合性。由于本法直接用霍乱弧菌超滤液制备类毒素，操作过程简单，成本较低，易于推广应用。

为了进一步观察霍乱类毒素的抗原性和免疫保护作用。本文将其经口灌入小鼠，然后用CT和有毒力的霍乱弧菌分别攻击。结果显示：类毒素免疫组的小鼠能够抑制CT，霍乱弧菌的肠道积液反应，同时血清中出现一定滴度的抗毒抗体。其保护作用与CT免疫组相似，比常规菌苗免疫组效果好。因而提示：加热霍乱类毒素作为一种口服抗原，能够刺激小鼠产生一定程度的肠道抗毒、抗菌保护和血清抗体反应。这为今后进一步应用到人体，提供了动物实验的依据。

STUDY ON PREPARATION AND ANTIGENICITY OF A HEATED CRUDE CHOLERA TOXION

Qu Zhenhai, et al

(Department of Microbiology, Xuzhou Medical College, Xuzhou, Jiangsu, China)

Crude cholera toxin, heated with water bath at 60 °C for 5 min, Lost 99 per cent of toxicity and 12.5 per cent of antigenicity. PAGE revealed that treated toxin had aggregated to polymer. P. O. immunized mice can produce a good intestinal antitoxinal protection and a certain amount of serous antibodies.

KEY WORDS cholera toxin; toxicity; antigenicity; mice

参 考 文 献

1. Holmgren J, et al. Develop Vaccine Drug Against Dia. Sweden: ISBN, 1986 : 9~22.
2. Craig JP, et al. Cutaneous responses to cholera skin toxin in man. I. Responses in unimmunized American males. J Infect Dis 1972; 125 : 203.
3. 陈慎宝, 等。用ELISA替代家兔皮肤限量蓝斑试验标定霍乱毒素。南京医学院学报 1985; 5 : 287。
4. Lange S, et al. Protective antitoxic cholera immunity in mice; Influence of route and number of immunizations and mode of action of protective antibodies. Acta Path Microbiol Scand Sect C 1978; 86 : 145.
5. 鲍行豪, 等。改良微量杀弧菌抗体检测方法的初步研究。副霍乱资料汇编。北京: 卫生部防疫司, 1985 : 248~253。
6. Kabir S. Immunochemical properties of the major outer membrane protein of *Vibrio cholera*. Infect Immun 1983; 39 : 452.
7. Cooper GN, et al. Recent Advances in cholera research. Bull WHO 1985; 63 : 841.
8. Levine MM, et al. Present status of cholera vaccines. Biochem Soci Trans 1984; 12 : 200.
9. Holmgren J, et al. Develop Vaccine Drug Against Dia. Sweden: ISBN 1986 : 33~43.

(1989年4月1日 收稿)