

大腸菌变种用于維生素 B₁₂ 微生物 測定法的研究*

高 俊 德 焦 尚 志

(北京市制藥厂研究室)

維生素 B₁₂ 是 Rikes^[1] 在 1948 年从肝臟中分离出的一种抗貧血因子的紅色結晶，可以临床应用于惡性貧血症的治疗。它的有效剂量甚小，往往是以微克計量之；所以無論在制剂工作上或診斷化驗上如不用超微量分析法是不能达到測定要求的。維生素 B₁₂ 的超微量分析法有物理光学法、化学比色定量法、生物測定法及微生物測定法等。其中常被采用的是微生物測定法；而微生物測定法中最初都是采用乳酸菌法。但乳酸菌法定量所用培养基的組成复杂，常要十几种氨基酸和維生素，往往不易备齐；所以近年来有許多国家都在研究比較簡單的大腸菌法来取代乳酸菌法。

大腸菌法的原理：是依据維生素 B₁₂ 可作某些大腸菌变种的發育因子。这就說明对維生素 B₁₂ 敏感的大腸菌在某一定条件下，它的發育就可能和維生素 B₁₂ 的存在与否或剂量大小呈一定規律。因之，如能掌握这个規律，以确定出适合的条件，則可通过該大腸菌的發育規律从而作出維生素 B₁₂ 的測定。根据这个道理，我們就大腸菌的發育和維生素 B₁₂ 的关系作了些試驗，証明大腸菌变种 (44110—1) 对維生素 B₁₂ 是相当敏感的。并利用杯碟法进行了維生素 B₁₂ 微生物測定法的研究。

实验材料及制备法

(一) 定量用菌种

大腸菌变种 (*Escherichia coli* 44110—1)。

(二) 定量用的主要工具

1. 培养皿：直徑 90 毫米，深 15 毫米，底平。
2. 不銹鋼小管：高 10±1 毫米，內徑 6±1 毫米，外徑 8±1 毫米。
3. 卡尺：精密程度 0.1 毫米。

* 1956 年 5 月 14 日收到。本文曾在中国藥学会北京分会 1956 年年会上宣讀。

其他設備與一般微生物實驗相同。

(三) 培养基配制

1. 菌种保存用培养基:

我們曾試驗过, Harrison 氏合成培养基^[2]、Jorgenson 氏無机鹽培养基^[3]及焦氏培养基^[4], 其中以焦氏培养基的菌苔發育較厚, 我們略加改良如下列成分, 作法也較簡便:

磷酸氢二鉀	7.0 克	硫酸氢	1.0 克
檸檬酸鈉	0.5 克	蛋白胨	2.0 克
磷酸二氢鉀	3.0 克	硫酸鎂	0.1 克
葡萄糖	2.0 克	維生素 B ₁₂	15 微克
瓊脂	25 克	蒸餾水	1000 毫升

pH=6.8 分注中試管, 110°C 20分鐘灭菌

2. 定量用培养基:

貯备液(甲)	氯化鉍	100 克	貯备液(乙)	磷酸氢二鉀	60 克
	硝酸鉍	40 克		磷酸二氢鉀	20 克
	蒸餾水	1000 毫升		蒸餾水	1000 毫升
貯备液(丙)	硼酸鈉	0.1 克	硫酸銅	0.25 克	
	硫酸亞鐵	0.5 克	氯化錳	0.46 克	
	硫酸鋅	4.90 克	鉍酸鉍	0.02 克	
	蒸餾水	1000 毫升			

此貯备液(丙)加 36% 鹽酸使溶液澄清。

配制法: 取貯备液(甲)250 毫升, 貯备液(乙)250 毫升及貯备液(丙)0.5 毫升, 將此三液混合后加入硫酸鎂 0.5 克及 0.1% 氯化鈣 6 毫升, 再加蒸餾水使成 4.6 升, 調節 pH = 7.2, 加瓊脂(按 2.5% 濃度加入), 溶解后分注燒瓶各 500 毫升, 置于高压灭菌鍋中热至 120°C, 30 分鐘灭菌备用。

葡萄糖溶液: 另取燒瓶單作 30% 葡萄糖溶液, 110°C 15分鐘灭菌备用*。

(四) 維生素 B₁₂ 标准溶液的配制

精確秤量維生素 B₁₂ 結晶(英国 Glaxo Laboratories LTD Bd 168)10 毫克, 用蒸餾水溶解于 1000 毫升的容量瓶中(核 10 微克/毫升), 临用时按需要稀釋。

(五) 定量用菌細胞混悬液的制备

于試驗前一天用上記菌种保存培养基(斜面), 接种該大腸菌在 37°C 培养 16~24 小时后, 用無菌操作取其新生之菌細胞三白金耳, 混悬于 10 毫升的灭菌生理食鹽水中; 再用离心机(4000 轉/分鐘)使菌細胞沉淀。將上澄液傾出, 反复洗滌沉淀三次, 將菌体

* 为了避免葡萄糖破坏和培养基变色, 故配此溶液与培养基应分別灭菌, 临用时混入培养基。

洗淨后再加灭菌生理食鹽水作成菌混悬液。其混濁程度按透光率应为 20% (用 620m μ 濾光板) 左右即可使用。

(六) 定量用杯碟的准备

取平底已灭菌的双碟, 在其背面中心部用臘笔画每边長約 40 毫米左右的正三角形 (用厚紙切成三角形沿边画之則更方便)。于其中央記明濃度。然后将备好的定量用培养基一瓶 500 毫释放水浴上加热, 溶解后放冷到 50°C 左右, 加入备好的 30% 葡萄糖溶液 40 毫升, 同时加入备好的菌細胞混悬液 8 毫升混好, 趁温倒入双碟。每碟傾入 20 毫升放在水平位置的玻璃板上, 使其凝成瓊脂平面。待其凝固后, 在每碟划綫的位置三角端上各放一枚不銹鋼小管, 于三角形各边外与皿壁間处各放一枚不銹鋼小管, 即在每碟中各适当位置放置不銹鋼小管六枚。

[注] 以上操作的要求应在無菌室或無菌箱內以無菌操作法进行。

实 驗

(一) 大腸菌的标准曲綫作法

经过許多次的試驗証明, 大腸菌变种 (*E. coli* 44110—1) 在某一定剂量范圍內, 其發育 (測其生長圈的直徑) 与剂量的对数成直綫关系, 尤以 0.01~0.5% 毫升剂量范圍內呈现相当敏感, 随采用真数剂量 (如表 1) 作标准曲綫。

表 1

稀 釋 記 号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
維生素 B ₁₂ 濃度 (γ/毫升)	0.05	0.10	0.15	0.20	0.25	0.30	0.35	0.40	0.45	0.50

取备妥的杯碟二十七只, 每三碟为一組, 共分成九組, 于每碟之六枚小杯中, 每隔一管盛 (5) 号标准品稀釋液 (为对照), 另三管每組盛同一濃度的标准液, 計每一組濃度共作九管, 而 (5) 号标准品稀釋液九組中共做八十一管, 將各管都加好后, 盖好放入保温箱中 37°C 培养約 14 小时以后, 即可取出用卡尺測量在各个濃度下菌生長圈的直徑 (讀到 $\frac{1}{10}$ 毫米), 先求八十一個 (5) 号濃度的各生長圈的平均值, 用此平均值来校正各組中 (5) 号濃度之生長圈的平均值, 再以此校正好了的每碟中 (5) 号濃度平均值, 补正各該碟中各濃度的平均值, 再求每組同一濃度生長圈的平均值, 实验結果如表 2。

以此生長圈直徑为縱座标。以維生素 B₁₂ 剂量为橫座标, 制成标准曲綫如圖 1。

表 2

稀 釋 記 号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
維生素 B ₁₂ 濃度 (γ/毫升)	0.05	0.10	0.15	0.20	0.25	0.30	0.35	0.40	0.45	0.50
生長圈直徑平均值 (毫米) (校正后)	18	18.5	19.3	19.9	20.5	21	21.5	22.2	22.7	23.2

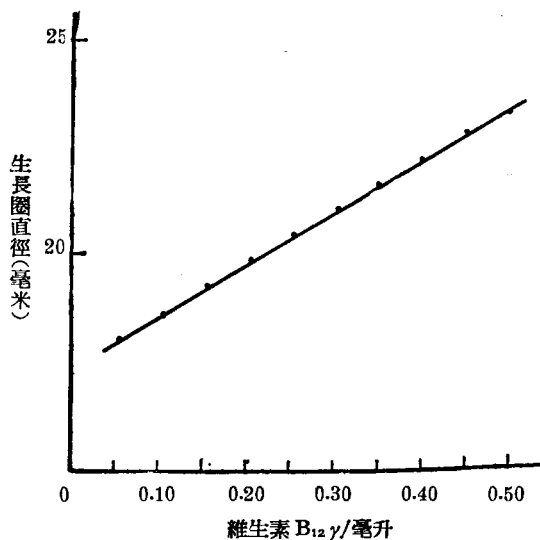


圖 1. 大腸菌變種(44110-1)標準曲線

(二) 样品測定

取本厂針剂車間試制的維生素 B₁₂ 注射液(原標示量為 15γ/毫升), 稀釋成三種不同濃度, 測得結果如表 3。

表 3

样品稀釋倍数	測得生長圈直徑(毫米) (補正后)	實測得維生素 B ₁₂ 含量(γ/毫升)	平均(如以 150 為 1 倍計 算則其他為其 2 倍和 4 倍)
150	18.5	0.100	0.1
75	20.0	0.210	0.105
37.5	22.5	0.425	0.106

將三個濃度都換算 150 × 時的平均值, 再放在一起平均之則

$$(0.106 + 0.105 + 0.100) \times \frac{1}{3} = 0.103 \gamma / \text{毫升}$$

即實測得含量相當於原標示量的 103%, 再按稀釋倍数換算 (0.103γ × 150 = 15.45 γ/毫升), 則知該样品中含維生素 B₁₂ 為 15.45γ/毫升, 按一般微生物測定法常規同一样品用不同濃度測得結果其單一濃度的平均值和總平均值不超過 10% 即可使用。由以

上数据看来, 这方法測得結果还是可以利用的。

(三) 回收試驗

取本厂針剂車間試制維生素 B₁₂ 样品不同濃度的溶液 1 毫升, 加入濃度为 2 γ /毫升的标准維生素 B₁₂ 結晶溶液 1 毫升, 混在一起, 測得結果如表 4。

表 4

样品稀釋倍数	标准維生素 B ₁₂ 溶液 (0.2 γ /毫升) 添加量 (毫升)	应含維生素 B ₁₂ 总量(γ /毫升)	实测得維生素 B ₁₂ 含量(γ /毫升)	百 分 比
75	0	0.20	0.20	
75	1	0.20	0.21	105
37.5	1	0.30	0.30	100
25	1	0.40	0.39	97.5

按以上結果看来, 样品中加进維生素 B₁₂ 的回收試驗結果, 其誤差不超过士 5%。

(四) 几种不同条件对大腸菌生長圈的关系

1. 扩散時間長短与大腸菌(*E. coli* 44110—1) 生長圈的关系: 加入同一濃度之試液后, 和保温前中間時間(扩散時間)的長短对生長圈的影响如表 5。

表 5

扩散時間(小时)	維生素 B ₁₂ 濃度(γ /毫升)	生長圈直徑(毫米)
0	0.25	23.25
2	0.25	24.75
4	0.25	25.41

2. 杯碟中培养基量多少(瓊脂層薄厚)对生長圈的影响如表 6。

表 6

維生素 B ₁₂ 濃度 (γ /毫升)	培养基量 (毫升)	培养基層厚度 (毫米)	生長圈直徑 (毫米)
0.25	20	3	23.33
0.25	45	8	21.33

(五) 肝精中維生素 B₁₂ 的定量

肝精定量时干扰物質消除的研究:

在許多文献中曾記載用大腸菌变种定量維生素 B₁₂ 时, 有蛋氨酸存在时会呈現干扰現象, 如焦瑞身氏^[1]报道过比濁法測定时, 若混有五万倍以上蛋氨酸, 則測定結果会高, 一般來說不必考虑, 苏联 Букин, В. Н.^[5]等所采用的大腸菌中, 一株对蛋氨酸和組胺酸有影响, 另外一株只对蛋氨酸有影响, 也称在一般試驗时不必考虑这点, 我們所使用

的大腸菌(*E. coli* 44110—1)对組氨酸并不敏感,对精氨酸略有影响,而对蛋氨酸则非常敏感,随單就蛋氨酸的关系作些試驗。結果見表 7 (試驗方法同上之杯碟法)。

表 7

蛋 氨 酸(γ /毫升)	生長圈(虛圈)直徑(毫米)	相当于維生素 B ₁₂ 測定时常 用剂量的倍数
10	—	—
25	10.5	100
50	20.5	200
100	31.5	400

由表 7 数据看出,用大腸菌 (*E. coli* 44110—1) 測定时,样品在維生素 B₁₂ 100 倍以上时,即可見呈虛圈。蛋氨酸和維生素 B₁₂ 單独和混合在一起时測得結果如表 8。

表 8

蛋氨酸或維生素	含 量(γ /毫升)	生長圈直徑(毫米)
蛋氨酸	100	虛圈 30.5
維生素 B ₁₂	0.2	实圈 23.5
蛋氨酸和維生素 B ₁₂	100+0.2	成双圈 虛圈 30.5 实圈 23.125

从以上結果看出大腸菌(*E. coli* 44110—1)对蛋氨酸虽然相当敏感,但由于生長圈的不同则可区别,所以在測定肝精中維生素 B₁₂ 含量时,只量实圈即可測出維生素 B₁₂ 的含量。

(六) 几种肝精的效价測定

依(五)的方法进行了几种不同肝精中維生素 B₁₂ 的含量測定,結果如表 9。

表 9

样 品	原 标 示 量	实测得維生素 B ₁₂ 含量 (γ /毫升)	实含量与标示量%
北京市制藥厂出品	15 克鮮肝/毫升	3.28	—
加 拿 大 出 品	2U.S.P. units/毫升	2.2	110
英 国 出 品	15U.S.P. units/毫升	12.75	85

样品批号:

1. 北京市制藥厂出品肝精第 18 批,标示量每毫升相当于 15 克鮮肝。
2. 加拿大出品肝精 Adanac chemical products of Canada Limited. Lot No. 512042. 2 U.S.P. units/ml.
3. 英国出品肝精 Winthrop Products Limited, by Bayer Products Limited (Campanam 15) England H. A. 440. 1ml=15 U.S.P. units.

总 結

1. 实验証明应用大腸菌变种(*E. coli* 44110—1) 杯碟法可作維生素 B₁₂ 的超微量分析, 其可用范围是 0.05—0.5 γ /毫升。

2. 通过实验証明用大腸菌变种(*E. coli* 44110—1) 杯碟法同样可測肝精中維生素 B₁₂ 的含量, 并采用两种已知含量的进口商品来对照試驗, 結果与原标示量極为接近。

3. 本方法与文献記載的乳酸菌杯碟法相比较, 本法材料簡單, 准备容易, 条件也比较容易控制。

志謝: 本实验蒙中国科学院植物生理研究所焦瑞身先生, 北京医学院藥学系徐玉均、湯汉芬教授及工業局陈福旭主任給以指正和鼓励, 特此致謝。

参 考 文 献

- [1] Rickes *et al.*, *Science*, 1948, 107, 396.
- [2] Harrison, E., Lees, K. A. & Wood, F., *Analyst*, 1954, 1, 98.
- [3] Jorgenson, E., Hoff., *Methods of Biochemical Analysis* 1954, 1, 98.
- [4] 焦瑞身 & Peterson, *Applied Microbiology*, 1953, 1, 42.
- [5] Букин, В. Н., Арешкин, Л. Я. и Кучева, Л., *Биохимия*, 1954, Т. 19, вып 6, 712.

MICROBIOLOGICAL ASSAY OF VITAMIN B₁₂ USING A MUTANT STRAIN OF *E. COLI*

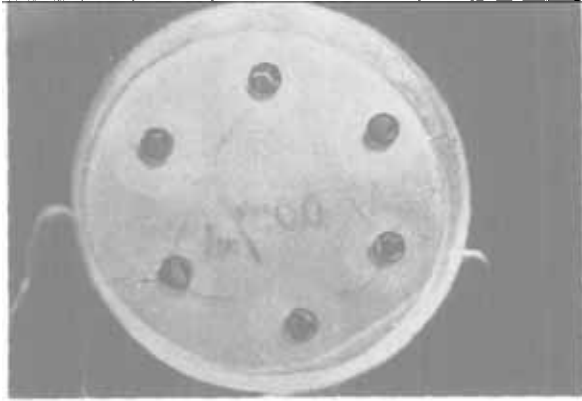
KAO TSIEN-TEH AND TSOU RHAN-CHIEH
(*Research Laboratory, Peking Pharmaceutical Works*)

ABSTRACT

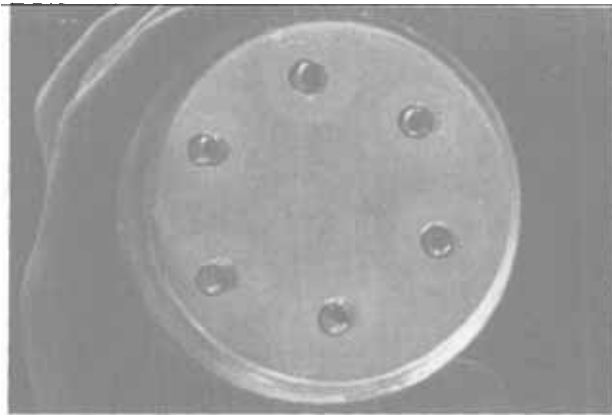
A mutant strain of *E. coli* (44110-1) was used in the cup-plate method for ultra-micro analysis of vitamin B₁₂. This method has been proved to be sensitive while the concentration of B₁₂ is within the range of 0.05—0.5 γ /ml.

B₁₂ contents in several samples of commercial liquid extract of liver were thus assayed and found to be approximately the same to that labelled.

The cup-plate method of employing *E. coli* as an assay organism is superior to that using Lactobacilli, for culture media and instruments used are easily obtained and the whole assay is not difficult to control.



杯碟法測定維生素 B₁₂ 的大腸菌变种生長圈(实物照片)



杯碟法大腸菌变种由維生素 B₁₂ 所生的实圈及維生素 B₁₂ 加蛋氨酸所呈現的双圈(内圈是实圈,外圈是虚圈)