

裂解素系統測定方法(酵母多糖法)的初步研究

馬振亞 居建民 方 亮

(陕西省中医研究所,西安) (西安医学院,西安)

裂解素系統的測定方法較為複雜,技術操作難于掌握,因而國內在免疫學的研究方面,尚未能廣泛應用。為了使國內一般實驗室能夠製備測定所需的主要材料,並進行測定,我們曾在這一方面進行了一些實驗。茲將主要材料、方法和結果作一簡要的報告。

(一) 酵母多糖(以下簡稱 Z)

于 25 克酵母菌中,加入蒸餾水約 200 毫升,然後在水浴中煮沸 3 小時,離心沉澱。沉渣內加入蒸餾水約 200 毫升,在水浴中煮沸 1 小時,離心沉澱,棄去上清液,然後將沉澱物加水洗滌 2 次。于沉澱物內加入 95% 酒精 200 毫升,離心沉澱,棄去上清液,用同法再作 1 次。于上述沉澱物內加入無水酒精 200 毫升浸漬半小時,離心沉澱,吸去酒精,真空抽干,保存備用。

在測定 Z 效能時,先將 Z 製成懸液。其制法如下:稱取 Z 100 毫克,加入生理鹽水約 10 毫升,于水浴中加熱煮沸 1 小時,離心沉澱,棄去上清液。于沉澱物中加入巴比妥緩沖液 1 毫升,即為 Z 混懸液,置普通冰箱中保存備用。初配成的活性低,若在 4℃ 放置 3—4 天(勿使凍冰)則活性較高。一般可用 10 天左右。

正式試驗時 Z 需要量的測定步驟與結果如表

1 所示。

由表 1 可知 8 毫克 Z 與 0.2 毫升標準血清內之裂解素結合,可使 0.1 毫升 RP 內之補體完全破壞。在正式測定裂解素時,即採用此量。

Z 需要量測定後,應以此量進行對 RP 影響的測定(方法略),觀察該量對 RP 有無抗補體作用。

我們所製作的 Z 經測定 8 毫克可與豚鼠家兔血清中裂解素結合,致使 0.1 毫升 RP 中的補體滅活,單獨使用時無滅活 RP 中補體的作用。雖用量較大,但製備較簡易,在 8 小時內即可制作出,故可以應用。

(二) 不含裂解素血清(以下簡稱 RP)

抽取家兔和豚鼠血液(每批最好各抽 10 只以上,其效價較穩定),分別放置于室溫內 15 分鐘,使其凝固後,立即保存于普通冰箱中,以備分離血清。將分離出的血清等量混合。將等量混合的血清進行補體效價測定,以每毫升半溶血單位在 100 以上者為準。于等量混合的血清中,加入 Z,置于 17℃ 水浴中 1 小時,然後于低溫環境下離心沉澱,取其上清液,再加入同樣量之 Z 如法處理,最後吸取上清液,此液即為 RP。將其分裝于干燥无

本文為中國微生物學會 1963 年學術年會轉稿。

表 1 Z 需要量的测定

管 号	1	2	3	4	5	6	标准血清*	RP*	致敏血球*
Z	16 毫 克 毫 升	12 0.2	8 0.2	4 0.2	2 0.2	1 0.2	<—>	<—>	<—>
标准血清(毫升)*	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	<—>	<—>
巴比妥液(毫升)	<—>	<—>	<—>	<—>	<—>	<—>	0.2	0.4	0.5

17℃ 水溫箱中 60 分钟后,离心沉淀,弃去上清液

RP (毫升)	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	—
---------	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	---

37℃ 水溫箱中作用 60 分钟

3% 致敏血球(毫升)	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
-------------	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

37℃ 水溫箱中作用 30 分钟,离心沉淀,观察结果

溶血情况	—	—	—	+	++	+++	++++	++++	—
------	---	---	---	---	----	-----	------	------	---

* 标准血清: 为含已知裂解素值(单位/毫升)之血清,每次使用时使其含裂解素 1 单位/毫升。或用 1:16 稀释大白鼠血清代替。

* 各项,于水溫箱中作用后,不经离心沉淀手续,以下各表均同。

<—> 表示不加试剂,以下各表均同。

菌的试管或安瓶内,保存于低温冰箱中(—20℃以下),以备应用。应用期一般为 3 天。

效价的测定是先 将 RP 稀 释 成 1:2, 置 17℃ 水浴中作用 1 小时,然后根据表 2 进行 RP 内补体含量的测定。

找出使 50% 血球溶解的 RP 稀释度,再乘以 10,即为该血清 1 毫升中所含补体的单位。如表中 1:8 的 RP,能使 50% 血球发生溶解,故知 1 毫升 RP 中含有补体 80 单位。

一般 1 毫升 RP 内,补体的滴度应该保持原血清补体滴度的 75%。

表 2 RP 内补体含量的测定

管 号	1	2	3	4	5	6	致敏血球
RP	1:2 稀 释 度 量(毫升)	1:4 0.1	1:6 0.1	1:8 0.1	1:10 0.1	1:12 0.1	<—>
巴比妥液(毫升)	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.5
3% 致敏血球(毫升)	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0

置 37℃ 水溫箱内 30 分钟

溶 血 现 象	+++	++++	+++	++	+	—	—
---------	-----	------	-----	----	---	---	---

然后再进行 RP 内裂解素是否去除净尽的测定(方法略),按照上述的计算法,计算 RP 内补体的单位,看其减低的程度如何。例如经测定 1:6 的 RP

为使 50% 血球溶解的稀释度,故知 1 毫升 RP 中,含有补体 60 单位,较原 RP 中补体减少 20 单位,一般补体之减低范围,应在 25% 以内,故此种 RP 尚适合于应用。

(三) 羊血球和溶血素 羊血球用 3% 悬液,溶血素为 4 个单位/毫升。

(四) 稀释液 用 pH 7.4 巴比妥缓冲盐水,按一般方法配制。

(五) 被检血清 抽取试验者血液 2—3 毫升,置入干燥清洁的玻璃管中,于室温中放置 1½—2 小时,然后离心沉淀,分离出血清,将其保存于低温冰箱内(—20℃),以备滴定。

测定方法和结果

裂解素的测定方法与步骤如表 3 所示。

裂解素的单位为在有适量的 Z 存在的情况下,于 37℃ 1 小时内,能使 1 毫升 RP 内的补体全部灭活的最小血清量,即为这一血清含裂解素 1 个单位。其具体计算如下:例如经上表测定 0.2 毫升 1:8 被检血清为未溶血之终点,则 0.2 毫升血清中含有 0.1 单位裂解素(因 RP 为 0.1 毫升),那么 1 毫升未稀释之被检血清应含裂解素之单位则为:

$$0.1 \times 1/0.2 \times 8 = 4 \text{ 单位}$$

兹将我们测定的正常人(大学二年级学生)和正常家兔的裂解素值列于表 4。

表3 裂解素的测定

试验管		1	2	3	4	5	6	7	被检* 血清	阳性血清		阴性血清		RP*	Z	致敏* 血球
被检血清	稀释度	1:2	1:4	1:8	1:12	1:16	1:20	1:24	1:2	1:2	1:2*	1:2	1:2*	<—>	<—>	<—>
	毫升	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	(阳性血清) 0.2 0.2		(阴性血清) 0.2 0.2		<—>	<—>	<—>
Z	毫克	8	8	8	8	8	8	8	<—>	8	<—>	8	<—>	<—>	8	<—>
	毫升	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	<—>	0.2	<—>	0.2	<—>	<—>	0.2	<—>
巴比妥液		<—>	<—>	<—>	<—>	<—>	<—>	<—>	0.2	<—>	0.2	<—>	0.2	0.4	0.2	0.5

17℃ 水温箱中 60 分钟,每 10 分钟振荡一次,离心沉淀,弃去上清液

RP(毫升)	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.2	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	<—>
--------	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

37℃ 水温箱中作用 60 分钟

3% 致敏血球	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
---------	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

37℃ 水温箱中作用 30 分钟,离心沉淀,观察结果

溶血举例	—	—	—	+	++	+++	++++	++++	—	++++	++++	++++	++++	++++	—
结果举例 [△]	(4)	(4)	(4)	(3)	(2)	(1)	(—)	正确	(4)	正确	(—)	正确	正确	正确	正确

“—”为阴性。△ 结果举例中带括号之数字为阳性之强度。

表4 正常人和家兔的裂解素值

	测定例数	裂解素平均值 (单位/毫升)	裂解素值范围 (单位/毫升)
人	80	4.2	0—8
兔	40	9.5	0.5—24

我们所测得数值与 Pillemer^[1] 和 Willers^[2] 所报告的数值基本上一致。当然本法尚存在上述

一些缺点(如 Z 为粗制品, RP 只计算补体含量等),故应进一步研究,更求其正确和简便。

参 考 文 献

- [1] Pillemer, L. et al.: *J. Exp. Med.*, **103**: 1, 1956.
 [2] Willers, T. M. N. et al.: *Vox sang.*, **4**: 21, 1959.