

裂解素的酵母多醣測定法*

华复一 陈璋 仲涛

(中国医学科学院输血及血液学研究所)

裂解素 (Properdin) 是人体与其他动物血清中的一种蛋白质成分, 一般认为它与机体的非特异性天然防卫因素有关^[1]。为了对裂解素系统进行深入的了解, 首先要确立恰当的测定方法。除 Pillemer 氏当初试用的酵母多醣 (Zymosan) 测定法外, 曾有很多作者利用裂解素的特殊生物学性质试探了多种可能的测定方式^[2-7]。但用不同方法测出之裂解素值互异, 而且与酵母多醣测定法的结果不一致, 故目前仍以酵母多醣测定法比较普遍。

这个方法的原则是裂解素与酵母多醣在 37°C 及合适的 Mg^{++} 浓度下, 能与 C_3 结合; 而灭活血清中的补体活力, 根据促使一定量 RP 中 C_3 完全灭活所需的标本血清量, 可以确定裂解素的效价。当初 Pillemer 氏^[8]应用此项反应时, 未考虑到此方法中血清标本本身带入之 C_3 的含量以后, 曾有不少作者对这个方法又作了改进^[9,10,11]。我们采用国产酵母制成酵母多醣以及自制其他测定裂解素用的各种生物制剂。本文将报道几种主要的酵母多醣测定方法的比较及若干具体步骤的改进。

一、实验方法

1. 测定用药物的配制

(1) pH 7.4 巴比妥缓冲液: 将 NaCl 85 克, 巴比妥 5.75 克, 巴比妥钠 3.75 克, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 1.017 克, $CaCl_2$ 0.166 克, 配制成溶液 2 升, 长期保存在冰箱内备用, 临用前以蒸馏水稀释 5 倍。

(2) 酵母多醣的制备: 采用国产健康牌鲜酵母或干酵母为原料, 制品包括经过胰蛋白酶消化及未经消化者两类。鲜酵母 1,000 克 (或干酵母 125 克), 用蒸馏水清洗一次后悬浮于 4 升 $\frac{1}{2}M Na_2HPO_4$ 溶液中, 在沸水浴中煮沸 1 小时。消化过程在冷却至 37°C 后开始。以 NaOH 调节 pH 至 8.0—8.2, 然后加入胰蛋白酶 0.5 克及足以掩盖液面的甲苯 5—20 毫升。放置在 37°C 保温箱中, 在消化期内每日调整其 pH, 每隔 3 天加入胰蛋白酶 0.5 克及甲苯 5 毫升。在第三次加入胰酶后, 如连续 5 天 pH 值均无明显改变, 即可结束消化过程。将消化后悬浮液离心, 收集沉淀, 加入 4 升蒸馏水, 在室温充分搅拌半小时, 将沉淀如是重复处理 2 次后, 复用煮沸之蒸馏水搅拌处理 3 次。然后以无水乙醇脱水, 先在 8 升 95% 乙醇中搅拌半小时, 再以 2 升无水乙醇与沉淀重复处理两次。最后在 500 毫升无水乙醇中迴流 1 小时, 放在真空干燥器中干燥保存。

制备未消化的酵母多醣, 除省略胰蛋白酶消化过程外, 其他步骤均相同。

由于上述步骤缩短了加热及搅拌的时间, 并减少一次真空干燥过程, 因此除消化过程外, 整个操作可在 1 天内完毕。所得产品与按 Pillemer 氏原操作法制成者功能相同。

酵母多醣悬浮液的制备是取一定量的干粉制品悬浮于 100 倍量的生理盐水中, 放入玻璃珠 6—8 个,

本文 1962 年 7 月 19 日收到。

* 本工作承蒙徐承熊、陈雅勇等同志指教协助, 谨致谢意。

注: 为叙述方便, 文中采用文献中的下述通用符号以代替全名: P=裂解素 (Properdin), Z=酵母多醣 (Zymosan), C=补体 (Complement), C_3 =补体第三成份, RP=缺少裂解素成份的血清。R₃=缺少补体的第三成份的血清。PZ=裂解素及酵母多醣的复合物 (Properdin-Zymosan Complex)。

沸水浴中搖蕩 1 小时,然后以巴比妥緩冲液將沉淀配成每毫升含 80 或 40 毫克悬浮液,置冰箱中备用。

(3) 敏感羊紅細胞溶液的配制: 采用改良的 Alsever 氏羊細胞保存液,可以避免配制过程中因高压灭菌处理出現的葡萄糖焦化現象。每 100 毫升保存液含 NaCl 0.42 克,葡萄糖 2.5 克,枸橼酸鈉 0.8 克,并以枸橼酸調节 pH 至 6.1。保存液与羊血的比例为 1.2:1。

用 10 倍量生理盐水將保存 2—14 天的羊細胞洗过 3 次后,用巴比妥緩冲液將羊細胞冲释成 2% 的悬浮液,然后与等量的每毫升含 4 个单位溶血素的緩冲液混合,敏感化后 1/2—4 小时内使用。羊細胞溶液中的紅細胞含量以 20—30 万/立方毫米为宜。

(4) RP (缺乏裂解素成分的血清)的制备: 用保存在 -20°C 冰箱中的 20 人以上的混合血清作为原料,其补体效价最好在 100 半溶血单位/毫升以上。取測定需用量的血清及其 1/20 容量之(每毫升含 80 毫克)消化酵母多醣(即表 2 所列之 A 型或 B 型)悬浮液,分別放置在 $16 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 水浴中,待两者的温度稳定后,在搖蕩血清的同时,逐量將酵母多醣悬液加入。繼續在水浴中放置 1 小时,每 10 分钟將混合液搖蕩 1 次。然后在 $0—5^{\circ}\text{C}$ 离心分离,取其上清液再用酵母多醣悬液在 $16 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 重复处理 1 小时,其上清液部分的血清即为 RP。分装后保存在 -20°C 冰箱中,可使用 5 天。

(5) R_3 (缺乏补体第三成分的血清)的制备: 取混合血清 2 毫升,加入每毫升含 40 毫克未消化的酵母多醣(即表 2 中的 C 型,如若采用 A 型酵母多醣亦可)的悬浮液 0.2 毫升,放置 37°C 水浴中,每 10 分钟搖蕩 1 次,并取出 0.2 毫升样品測定其补体活力。一般在 20—40 分钟处理后补体完全灭活,即全部 C_3 已被酵母多醣吸附。然后按此作用時間以同样处理方式制备需要量的 R_3 。在 $0—5^{\circ}\text{C}$ 离心后,取其上清 R_3 血清部分冷冻备用。

2. 測定用特殊制剂的鉴定

(1) 裂解素測定中所需酵母多醣用量的測定: 由于我們在裂解素測定中参考 Чертков 氏^[9]介紹的方式,仅用 RP 0.1 毫升,故在确定酵母多醣用量測定中也仅用 RP 0.1 毫升。

取 100×10 毫米試管 7 支,先各放入巴比妥緩冲液 0.2 毫升,然后在第一管放入 40 毫克/毫升的 A 或 C 型酵母多醣悬浮液 0.2 毫升,混合后,进行逐次倍量稀释至第六管,从第六管弃去 0.2 毫升。然后各管加入 RP 0.1 毫升及 1/16 稀释的大白鼠混合血清(代替 1 单位/毫升裂解素溶液) 0.2 毫升。另置試管 7 支以巴比妥緩冲液代替大白鼠血清用作对照。將上述两排試管放入 37°C 水浴 1 小时,各加入敏感羊細胞 1 毫升,再在 37°C 水浴中放置半小时,离心观察結果。一般在第一排試管之前 3 至 5 管的补体被灭活,計算其酵母多醣之需用量即为 1 至 0.25 毫克。合适的酵母多醣悬浮液应无抗补体现象,故对照排各管均呈充分溶血。

(2) R_3 血清的鉴定: 根据 R_3 血清的要求,0.2 毫升 R_3 对 1 毫升敏感羊血球应不导致溶血,此点在制备过程中业已証实。为証实每次制备之 R_3 血清含有足够量的 C_1' 、 C_2' 及 C_3' ; 0.1 毫升 R_3 应能促使新鮮血清之补体效价增至 150% 以上。可取試管 10 支,依次放入 1/15 稀释的新鮮血清 0.4、0.35、0.3、0.25 毫升及 1/30 稀释血清 0.4、0.35、0.3、0.25、0.2 毫升;然后每管加入相应量巴比妥緩冲液,使各管之总液量均为 0.4 毫升,最后每管加入 R_3 0.1 毫升及敏感羊細胞 1 毫升。另置一排測定新鮮血清补体效价的对比管,各管之血清稀释情况与第一排相同,惟 0.1 毫升之 R_3 則以巴比妥緩冲液代替。两排試管均放置在 37°C 水浴中半小时,离心后观察其半溶血效价,且对比計算加入 R_3 血清后补体效价增长之百分率,以确定該 R_3 血清是否合用。

(3) RP 血清的鉴定: RP 血清与 P 及 Z 在 37°C 作用 1 小时后,其 C_3' 活力完全消失,此点在酵母多醣用量鉴定中已获証实。此外它必須对新鮮血清不呈抗补体作用,其 C_3' 效价应在每毫升 60—90 单位之間,且不低于原血清 C_3' 效价的 75%。当 RP 与 Z 在 37°C 作用 1 小时后,其 C_3' 效价之下降不应超出 25%,以說明 RP 血清中之裂解素已否充分去除。

其鉴定方法可将 RP 先按三种情况处理:(1)按每 0.1 毫升 RP 加入 1 毫克酵母多醣(A 或 C 型)的比例,將 RP 与酵母多醣悬浮液混合放置 37°C 水浴中 1 小时;(2)不加酵母多醣之 RP 在 37°C 放置 1 小时;

(3)未經 37°C 加溫之 RP。3 种标本均按照 R₃ 鉴定中測定 C₃' 效价的方式測定其 C₃' 活力,然后对比其效价,以审定此 RP 制品是否合用。

3. 裂解素的測定: 为了比較几种利用酵母多醣吸附原理測定裂解素方法的优缺点,我們共試驗了 3 种不同的測定方法。表 1 即示其具体操作步驟的异同。

表 1 三种測定方法的操作步驟

管 号		1	2	3	4	5	6	7
1. 稀釋标本	第(1)(2)法	緩冲盐水 (毫升)	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
	第(3)法	緩冲盐水 (毫升)	—	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
2. 加入 Z	第(1)(2)(3)法	各管加入 A 型或 C 型酵母多醣 0.5—1 毫克,即 4—8 毫克/毫升悬 浮液 0.2 毫升						
3. PZ 結合	第(2)(3)法	17°C 水浴放置 1 小时,每 10 分钟搖蕩 1 次 分离及清洗 PZ 复合物(豚鼠血清必需用緩冲盐水洗两次,人血清 标本可在旋离 PZ 沉淀前加入緩冲盐水 2 毫升以代替清洗手續)						
4. 加入 RP	第(1)法	各管加入 RP 0.1 毫升						
	第(2)(3)法	各管加入 1/4 稀釋 RP 0.4 毫升						
5. PZC ₃ ' 結合	第(1)(2)(3)法	37°C 水浴放置 1 小时,每 10 分钟搖蕩 1 次						
6. 測定补体 灭活情况	第(1)(2)(3)法	各管加入敏感羊細胞 1 毫升 37°C 水浴半小时,离心后根据有无溶血判断結果						

第一法与 Pillemer 氏的原始方法类同^[8]。

在第二法的測定中增加 PZ 复合物分离的过程^[10]。稀釋各管加入酵母多醣后,放置在 16—17°C 水浴中 1 小时,每 10 分钟搖蕩 1 次,然后离心弃去上清液,复以緩冲盐水洗沉淀二次,以除去标本中的补体及抑制因素,再在每管 PZ 沉淀中加入 1/4 RP 0.4 毫升,此后各步驟与第一法相同。

第三法的測定步驟除稀釋过程外,其他过程均与第二法相同,稀釋时第一管的緩冲盐水 0.2 毫升被 RP 代替。这样在 PZ 結合时可以利用其中的血清輔助因素,而 RP 中的补体成分則在分离 PZ 沉淀时仍随上清液弃去,对以后各步驟并无影响。其原理与 Willers 氏改良法类同^[11]。

二、实验結果

我們用国产健康牌鮮酵母依照前述經過消化过程的操作步驟,曾获得符合各項要求的(即 Pillemer 氏所称的)A 型酵母多醣。但鮮酵母保存期太短,且在一般城市不易购到。以健康牌干酵母为原料,經過消化而获得的成品相当于 B 型酵母多醣,用之可制成滿意的 RP,未經消化而获得的成品相当于 C 型酵母多醣,可用以制备 R₃ 及測定裂解素。按不同要求兼用两者亦可解决全部需要。这几种不同酵母多醣制品的性能如表 2 所示。

在制备酵母多醣时,無論消化过程中的 pH、加热或攪拌時間、洗滌及脫水步驟等方面均較 Pillemer 氏原法簡便。实验証明,处理过程无需如文献中^[8]所述的繁长。制成的酵母多醣干粉如保存在真空干燥容器内,可保持活性 1 年以上。

我們应用三种方法測定各种常見动物的正常血清裂解素值的結果如表 3 所示。其中鼠与牛的裂解素值較高。同一种动物的个体間也存在着頗大的差异。

表 2 不同种酵母多酶制品的性能差异

采用原料	鲜或干酵母	干酵母	干酵母	干酵母
提取方法	消化法	消化法	未經消化	Rzucidlo 氏法 ^[12]
制品含氮量	2.6—3.2%	2.8—3.7%	6.5—7.5%	—
制品色泽	灰白	灰白	灰白	灰白微黄
在17°C与裂解素結合性能	強	強	強	弱
制成滿意 RP	能	能	不能	不能
在37°C灭活 C ₃ 之性能	強	弱	強	弱
制成滿意 R ₃	能	不能	能	不能
相当于 Pillemer 氏之型別 ^[8]	A型	B型	C型	D型
实用价值	1. 制备 RP 2. 制备 R ₃ 3. 測定裂解素	1. 制备 RP. 2. 提取純 P.	1. 制备 R ₃ 2. 測定裂解素	

表 3 各种动物的正常血清裂解素值

动物名称	标本数	血清裂解素值范围(单位/毫升)		
		第一法	第二法	第三法
人	19—49*	0—8	0—8	<0.5—8
牛	4	8—24	6—12	8—24
羊	4	4—8	4—8	4—8
狗	6	0—12	2—12	2—12
兔	10	2—24	1—16	4—24
大白鼠	6	8—32	8—24	8—24
小白鼠	6	8—16	8—16	8—32
豚鼠	6	0—2	8—16	8—16

* 詳見表 5。

各标本在应用三种测定方法获得的结果之間,其相互关系并不一致;如表 4 所示,其主要差异情况为下列五类:(1)三种方法的测定值基本一致。羊血清标本中大多如此。人血清标本中約占 38%;(2)应用第一法虽可测出其裂解素值但低于其他两种方法之测定结果,这种情况在正常人血清标本中約占 31%;(3)应用第二、第三法时可以测出其裂解素效价,但应用第一法测定时裂解素效价为 0。豚鼠血清标本大多属这类情况,家犬血清标本亦頗多如此。人血清标本中虽較少見,但仍有 16.6% 呈此情况;(4)用第二及第三法可以测出其效价,但在应用第一法测定时,第一管有明显溶血,而第二、第三管仍有輕度溶血,掩盖了原应出現的不溶血结果。因而在不同稀释度的玻管中,并无一管出現完全不溶血而造成不能确定其裂解素效价的現象。在 42 例正常人血清标本中有 3 例如此,占 7.1% (表 5);(5)第一及第三法之测定结果相一致,而第二法之测定值則低于其他二法。这种情况在家兔血清标本中頗多。根据这五种情况来看,人、家犬和豚鼠的标本最好采用第二或第三法;家兔血清标本則应用第一或第三法比較合适。

应用第一法测定的 42 例正常人血清中除有 3 例无法确定其效价外,其余 39 例血清的裂解素平均值为 1.91 单位/毫升(以 $< \frac{1}{2}$ 做为 0.25 計算)。在此 39 例中有 7 例裂解素之测定值为 0,此 7 例在应用第二或第三法时,均可测出其裂解素值。应用第二法测定之 49 例,其正常值平均为 2.94 单位/毫升。其中仅一例裂解素之测定值为 0,但当以第一或第三法测定該血清标本时,第一管虽亦有輕度溶血,然其程度弱于其他各管,故不能判断为

表 4 三种测定方法所得裂解素值的五类相互关系

类别	标本例	测定方法	不同裂解素单位各管中溶血情况							裂解素值 (单位/毫升)
			1	2	4	6	8	12	16	
第一类	人 ₃	第一法	+	-	-	++++	+++	+++		4
		第二法	-	-	-	++++	+++	+++		4
		第三法	-	-	-	++++	+++	+++		4
第二类	人 ₃	第一法	-	+++	++++	++++	++++	+++		1
		第二法	-	-	-	++++	+++	+++		4
		第三法	-	-	-	++++	+++	+++		4
第三类	狗 ₁	第一法	++++	++++	++++		++++		+++	0
		第二法	-	-	-		±		+++	6
		第三法	-	-	-		±		+++	6
第四类	人 ₃₂	第一法	++	+	+++	++++	++++	+++		?
		第二法	-	-	+++	++++	++++	+++		2
第五类	兔 ₃	第一法	-	-	-		-		±	12
		第二法	-	-	-		±		+++	6
		第三法	-	-	-		-		±	12

注：“-”不溶血；“+”轻微溶血；“++，+++”中等度溶血；“++++”呈与对照管相同的高度溶血；“?”指无法判定其效价者。

0，而应为<0.5 单位/毫升。故在 49 个正常人标本中，虽在单独应用某一测定方法时有血清裂解素值为 0 的个例，但如以其他方法进行校核时，仍可发现有裂解素活性存在。19 例正常人血清标本，以第三法测定之裂解素平均值为 2.84 单位/毫升。表 5 为应用三种方法测定正常人血清裂解素值的结果。

表 5 应用三种方法测定正常人血清裂解素值的结果

测定方法	血清标本裂解素值(单位/毫升)											总例数	平均值	
	0	?	<1/8	1/2	1	2	3	4	5	6	7			8
第一法(例数)	7	3	4	5	7	4	4	4		2		2	42	1.91
第二法(例数)	1			2	2	20	9	9	2	2		2	49	2.94
第三法(例数)			1	1	3	5	2	5		1		1	19	2.84

注：“?”指无法判定其效价者。

三、摘 要

1. 本文总结了采用国产健康牌酵母制成的酵母多醣及测定裂解素用的各种生物制剂的过程，并介绍了测定裂解素的三种具体方法和体会。

2. 根据酵母多醣吸附原则，我们就 Pillemer 氏原始方法(第一法)、分离 PZ 复合物的方法(第二法)及改良的分离 PZ 法(第三法)三者进行了比较。第一法测定结果会受到血清标本中带入的补体和抑制因素的影响。第二法中的 PZ 结合程度则又可能因标本中缺乏血清辅助因素而受到限制。第三法则已排除这些因素。根据测定结果，人、家犬及豚鼠的血清不宜用第一法测定，兔血清标本则不宜用第二法测定。

3. 动物物种间的血清裂解素值虽有差别，但同一物种的各个体间也存在着极大的差

异,故不能单独用裂解素值的高低来解释不同种动物間天然抵抗力的差异。

4. 正常人血清裂解素的平均值应用第一法的测定结果为 1.91 单位/毫升。应用第二及第三法的结果则分别为 2.94 及 2.84 单位/毫升。

5. 在用第一法测定时,有 16.7% 的正常人血清标本其裂解素值为 0,应用第二法时仅有 2%,我们认为不能测出若干正常人血清的裂解素是由于方法中的缺陷,尚难因此而否定裂解素与机体抵抗力的关系。

参 考 文 献

- [1] 陈 璋等: 裂解素系统, 未发表资料。
 [2] Wardlaw, A. C., Blum, L., Pillemer, L.: *Fed. Proc.*, 14:480, 1955.
 [3] Carl F. Hinz, Jr., Janet Abraham and Laus Pillaemer: *Proc. Soc. Exp. Biol. & Med.*, 94:230, 1957.
 [4] Pillemer, L.: *Sci.*, 125:1244, 1957.
 [5] Ginsberg, H. S. and Wedgwood, R. J.: *Ann. New York Acad. Sci.*, 66:251, 1956.
 [6] Barlow, L., van Vunakis, H. and Levine, L.: *J. Immunol.*, 80:339 & 349, 1958.
 [7] Cowan, K. M.: *Sci.*, 128:778, 1958.
 [8] Pillemer, L., Blum, L., Lepow, I. H., Wurz, L., and Told, E. W.: *J. Exp. Med.*, 103:1, 1956.
 [9] Чертков, И. Л.: *Проб. Гемат. и Перел. Крови.*, 6:53, 1959.
 [10] Leon, M. A.: *J. Exp. Med.*, 103:285, 1956.
 [11] Willers, J. M. N., Pondman, K. S. and Winkler, K. C.: *Vox Sang.*, 4:21, 1959.
 [12] Rzucidto, L., et al.: *Bull. Acad. Polonaise Sci.*, CI, II, 4(12):427—430, 1956.

ZYMOSAN ASSAY METHODS OF PROPERDIN

HUA FU-YI CHEN ZHANG ZHONG TAO

(Institute of Blood Diseases and Blood Transfusion, Chinese Academy of Medical Sciences)

The paper introduces a simplified process of preparing zymosan from yeast and the procedures of preparing various biological preparations which have to be used in the zymosan assay. The results of the three different methods of the zymosan assay of properdin are also compared.

According to the principles of zymosan adsorption, results obtained by the first method (Pillemer's original procedure) were influenced by the inhibiting factors and complement in the serum samples; while the PZ combination process in the second method (method of isolating PZ complex) showed limitations due to the relative deficiency of co-factors in certain serum samples. In the third method (modified PZ isolating method) all such defects were excluded. Besides it was also found that the first method was not suitable for testing the serum samples of human beings, dogs and guinea pigs; while the second method was not satisfactory in the case of the serum samples of rabbits.

When the first method was used, properdin could not be detected in 16.6% of the normal human serum samples. But it was reduced to 2% if the second method was employed. It is believed that the absence of serum properdin in certain normal serum samples is most likely due to the defects in the methods.

As reported in the literature, differences in serum properdin titer were found in different animal species but they were even more striking between individuals of the same species. Thus the mechanism of difference in natural resistance in different animal species could not be explained by the difference of serum properdin level.

Using the first, second and third method, the normal mean value of serum properdin titer of Chinese adults was 1.74, 2.98 and 2.84 unit/ml., respectively.