

血清溶菌酶活性的光学测定法

甘肃省卫生防疫站劳动卫生科

溶菌酶是生物体内一种非特异性免疫物质,存在于细胞溶菌体内。人血清溶菌酶为粒细胞溶菌体崩解时所释放,当患单核性粒细胞白血病、结核、肾病和炎症时酶活性增高。据近年报道,矽肺患者和感染石英粉尘的动物,由于肺内吞噬细胞吞食石英后溶菌体膜破坏,释放的溶菌酶亦能入血。故在白血病,职业病等临床早期诊断上有一定价值。溶菌酶测定法应用虽历时已久,但方法不一,各测定结果很难互相比较,影响了在临床和预防医学上的应用。

溶菌酶测定方法,最早使用含酶的生物材料培养在含菌液的琼脂平板上,观察抑菌透明区大小或对细菌悬液的透明程度来鉴定酶的溶菌活性。1938年,首次用光学比浊法,将菌液与酶混合后,根据其浊度变化,经与标准浊度列比较而测定。1946年分离出结晶的溶菌酶后,才建立起精确的定量方法。其后,在实践中不断改进,逐步提供了血清,尿溶菌酶的标准检验方法。1968年,中国医学科学院卫生研究所研究溶菌酶用于矽肺早期诊断时,采用改良的洛氏法(Losquet)。为了继续在实践中检验溶菌酶对矽肺的诊断价值,我们对酶的测定方法作了进一步探索,通过实验,基本上掌握了影响因素,以供实际应用参考。

一、实验材料和方法

溶菌酶测定原理是利用溶菌酶对细菌的溶解作用,采用对酶较敏感的菌株 *Micrococcus lysodeikticus* 悬液作为底物,根据酶作用菌液光密度减少值测定酶活性。

(一) 材料

1. 菌种

Micrococcus lysodeikticus, 中国科学院微生物研究所 1.634 号。

2. 磷酸盐缓冲液

(1) $M/15$ 磷酸二氢钾 (KH_2PO_4) 溶液
称取 9.078 克 KH_2PO_4 溶解于 1 升蒸馏水中。

(2) $M/15$ 磷酸氢二钠 (Na_2HPO_4) 溶液
取 $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 于干燥器中放置 10—14 天,失去结晶水,称取 11.876 克溶于 1 升蒸馏水中。

将(1)与(2)两液以 73:27 比例混合,并用酸度计调整 pH 到 6.2—6.4。

3. 新鲜菌液配制

将 *M. lysodeikticus* 接种于肉汤琼脂斜面,在 37℃ 培养 18—24 小时,用磷酸盐缓冲液自斜面洗下细菌,配成混悬菌液,使用时调整菌液透光率到 30—40% (波长 640 毫微米)。

4. 溶菌酶标准溶液

准确称取溶菌酶(上海禽蛋二厂或中国科学院生化研究所东风试剂厂产品)干粉 100 毫克,溶于 100 毫升磷酸缓冲液,制成 1 毫克/毫升的贮备液。临用前,稀释成每毫升 2.0、4.0、6.0、8.0、10.0、15.0、20.0 微克的标准溶液。

(二) 测定

1. 样品

取 0.1 毫升新鲜血清于小试管中,置 37℃ 水浴中预热 5 分钟,向管内加入 37℃ 预热的菌液 2.0 毫升,混匀。立即记下开始时间,两分钟后加入 1 滴 5N KOH (约 0.05 毫升)以停止反应。立即将菌液倒入光程 0.5 公分的比色杯中,在波长 640 毫微米测定光密度 D_1 。

另取 0.1 毫升血清,先加入 1 滴 5N KOH,摇匀,在 37℃ 预热 5 分钟,再加入 2.0 毫升经 37℃ 预热的菌液,在同样温度下 2 分钟后记录其光密度 D_0 。

D_0-D_1 光密度差值,即血清溶菌酶所致的透光率变化,查标准曲线求得酶活性。

2. 标准曲线

以 0.1 毫升不同浓度的酶标准溶液代替血清,操作步骤方法与样品方法相同。以与空白液光密度差值 (D_0-D_1), 和溶菌酶浓度绘制标准曲线。

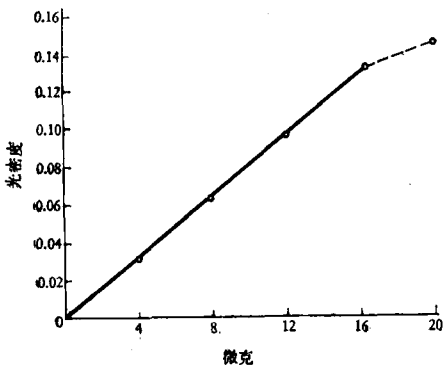


图 1 37℃ 2 分钟溶菌酶标准曲线
(菌液透光率 30%)

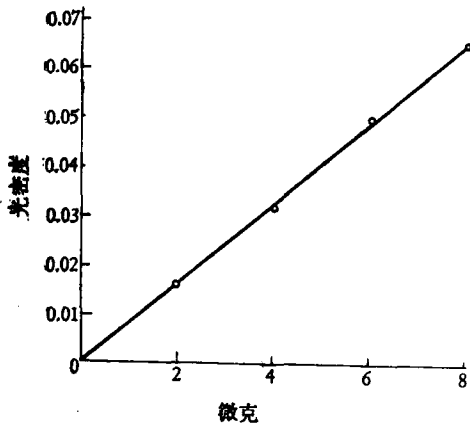


图 2 37℃ 10 分钟溶菌酶标准曲线
(菌液透光率 35%)

二、实验条件

1. 反应温度

对同一份血清在 37℃ 和 25℃ 两种反应温度加以比较,以 10.0 微克/毫升酶标准溶液作为对照。结果见表 1。

由表 1 可知,10 微克/毫升溶菌酶的光密度值在 37℃ 时为 25℃ 时的 1.9 倍,而血清在 37℃ 时为 25℃ 时的 4.1 倍,两者增长比例不

同。即在 37℃ 时反应结果较 25℃ 时约高 1 倍以上。两种反应温度比较,37℃ 较 25℃ 时,方法的偏差略小,精密度高。

表 1 人血清和酶标准液在不同反应温度下的比较

反应温度 (℃)	酶标准液 (10 微克)		人 血 清	
	光密度差值	偏差(%)	光密度差值	偏差 %
37	0.130	±2.1	0.041	±1.7
25	0.069	±6.8	0.010	±2.7
37/25	1.9	—	4.1	—

2. 不同反应时间的酶作用速率

溶菌作用取决于反应温度和时间。反应时间不同,酶作用速率也不同。用不同浓度的酶标准溶液在 37℃ 和 25℃ 下,经 2、4、6、8、10、15、20 分钟作用,分别测定其光密度差值。

由测定结果可知,菌液透光率在 20 分钟内透光率基本不变,故其沉淀作用因素可以忽略不计。

高浓度组 (50—150 微克/毫升): 结果见图 3—6。

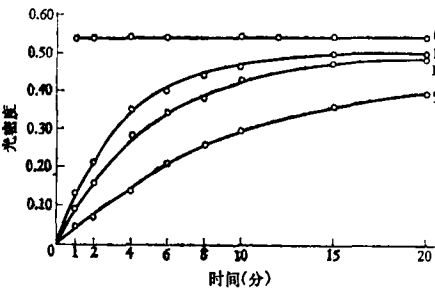


图 3 50—150 微克溶菌酶不同时间的反应速率(37℃)

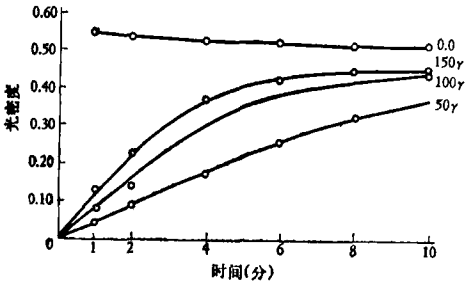


图 4 50—150 微克溶菌酶不同时间的反应速率(25℃)

由图 3 和 4 可见,酶作用速率在 4 分钟内最快,4—20 分钟速率减慢;含酶浓度愈高,作用时间愈长,反应速率愈慢。

图 5 和 6 是表示在不同反应时间观察不同酶浓度与光密度差值的关系。在 50—150 微克范围内, 作用 1 分、2 分钟的酶浓度-光密度差值呈直线关系; 4 分钟以上则不呈直线关系。25℃ 和 37℃ 时均显示同一规律。

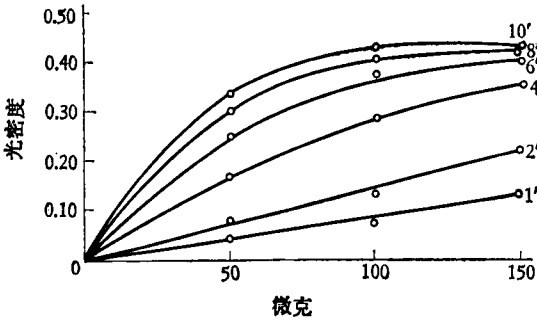


图 5 不同反应时间酶浓度与光密度差值的关系 (37℃, 50—150 微克)

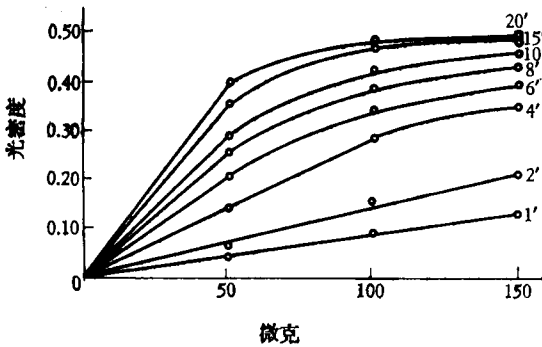


图 6 不同反应时间酶浓度与光密度差值的关系(25℃)

低浓度组 (含酶 5—20 微克): 见图 7、8。在 37℃ 下 5 微克时 2—10 分钟, 反应速率呈直线上升, 10 微克以上 4 分钟内, 反应速率随时间呈直线上升, 4 分钟后反应速率减低。 25℃ 时, 5—15 微克在 10 分钟内, 反应速率保持直线关系。

由图 8 可见, 在 5—20 微克范围, 37℃ 下 2—4 分钟, 酶浓度-光密度差值呈直线关系, 6 分钟后不呈直线关系。25℃ 8 分钟内呈直线关系。10 分钟时随酶浓度增加, 反应速率并不直线上升, 且各点偏离较大。

总之, 溶菌作用的反应速率与酶浓度在 2—4 分钟内保持直线关系, 反应时间愈长, 酶反应速率减低。 在测定时, 较高浓度以 37℃ 反应 2—4 分钟内, 较低浓度时, 以 37℃ 10 分钟内为

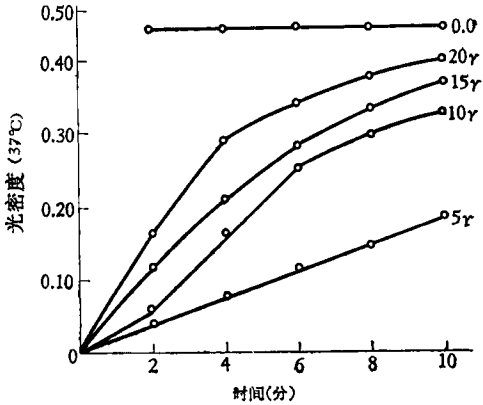
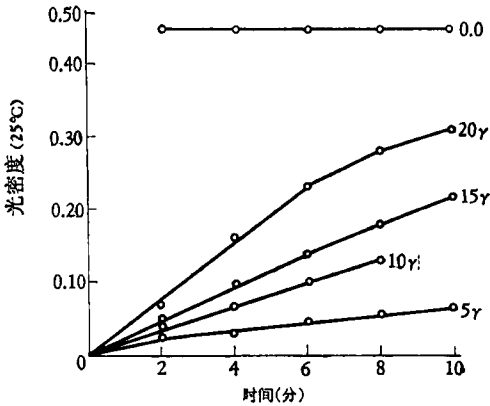


图 7 5—20 微克溶菌酶不同时间的反应速率

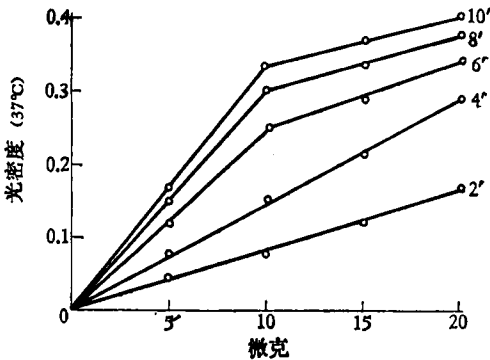
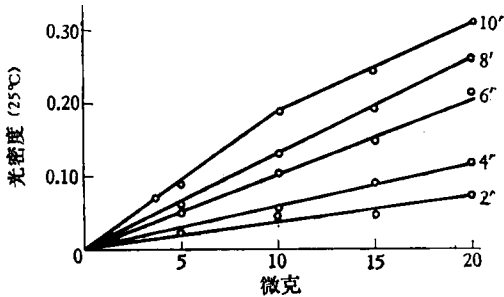


图 8 两种温度下不同反应时间酶浓度与光密度差值的关系 (5—20 微克)

宜。

3. 不同底物(菌液)浓度对测定的影响

在酶的反应中，底物浓度对反应速率有较大影响。本实验底物为菌液，将菌液配制成20—60%透光率的不同浓度悬液，再加入10—100微克的溶菌酶，分别在37℃、25℃反应2分钟，测定其光密度差值。结果见图9。

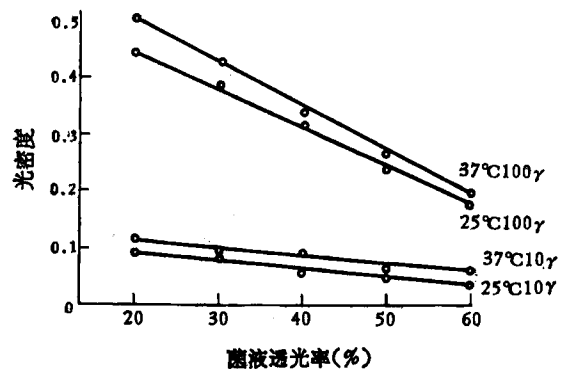


图9 不同透光率的菌液对反应速率的影响

由图9可见，透光率愈高，即菌液浓度愈低时，光密度差值愈小，呈直线下降；高浓度酶(100微克)的直线斜率大，表明底物浓度改变影响大；而对低浓度酶(10微克)的影响则较小。37℃、25℃均出现同一规律。故为获得前后一致的结果，标准与样品，各批样品的测定，应采用相同的菌液浓度，以减少测定误差，便于比较。

4. 菌液放置时间的影响

在0℃和15℃温度下，将菌液分别在开口和密闭容器内放置不同时间，观察其透光率变化。结果见表2。

表2 不同放置时间菌液稳定性(透光率%)

时 间 (日)	0℃		15°—20℃	
	密 闭	开 口	密 闭	开 口
1	45.0	45.0	45.0	45.0
2	44.5	44.5	45.0	44.0
3	44.5	44.5	44.8	43.8
4	—	45.2	45.0	44.0
5	—	43.4	47.0	43.4
6	—	44.0	47.2	44.0

由表2知，菌液保持在0℃和15°—20℃条件下，菌液浓度改变不大，10天内相差不超

过2%，基本稳定不变。

5. 人血清保存时间

取新鲜人血在3小时内分离出血清，在0℃和15℃下保存不同时间，测定其酶活性。结果见图10。表明无论在0℃和15℃，血清溶菌酶活性均有下降，放置三天后酶活性下降更显著。采血后宜尽快测定。

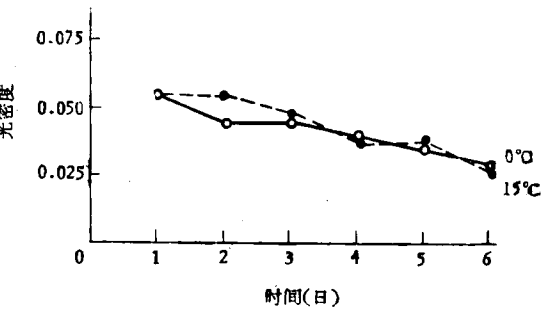


图10 人血清保存时间对溶菌酶活性的影响

6. 方法精密度

根据对空白值、10微克酶标准液、人血清的重复测定结果，方法精密度以相对偏差表示：37℃、2分钟反应空白值为±0.7%；10微克酶标准溶液为±2.1%；人血清为±1.7%。25℃、2分钟空白值为±6.8%；10微克标准液为±2.2%；人血清为±2.7%。均以37℃为最好，25℃时亦不超过7%，说明方法精密度良好。

三、讨 论

溶菌酶的光学测定方法简便，易推广。但影响因素较多，如不加控制，则导致误差。其中温度和时间有重要影响。据资料报告，曾采用37℃、25℃、52℃三种温度加以比较，以37℃恒温，测定结果最好。我们实验证明，37℃、25℃皆适用，但以37℃测得的直线关系好，偏差小，接近生理条件，以37℃为宜。

酶与底物的反应时间，以往报道以30—60秒最好。通过本次实验证实，酶浓度与反应速率呈直线关系的范围，可以通过改变酶与底物的比例及菌液浓度加以调整。酶浓度高，反应时间宜短些；酶浓度低，反应时间可延长，以保持直线关系。降低菌液透光率也可扩大直线范

围。当使用0.1毫升酶标准溶液,菌液浓度透光率30%左右,37℃10分钟可使0—8微克酶保持直线关系;37℃2分钟可使0—16微克酶保持直线关系。一般酶反应,对底物浓度要求应过量。据实际测定,当菌液透光率在30%以下时,菌液浓度的变化可引起测定结果有较大误差,故采用透光率25—30%的菌液作为底物。过去记载,多用紫外线灭活的 *M. lysodeikticus* 配制成悬液,以保持菌液稳定。本实验采用活菌悬液,未经灭活,但在密闭或开口容器中0°—20℃内保持10天,透光率基本不变。

反应pH值的最佳范围,据报道为6—7,本次实验所用缓冲液pH值为6.2—6.4。反应的离子浓度仍沿用0.067M磷酸盐缓冲液,有人认为底物中加入氯化钠,可改善方法的线性关系。但有的研究证明,加入钠离子对酶活性和细菌的敏感性不利。本实验未加入氯化钠,血清中钠含量已经高度稀释,故可忽视。

溶菌酶本身不够稳定,Zucker等提出,在一20℃可保存数月,4℃可保持7天以上,实

验用酶溶液均为新鲜配制,酶干粉需研磨溶解并过滤。实验证明过滤对菌液透光率影响不大。血清保存时间应尽量短,在0℃—15℃保存三天,酶活性显著下降。

血清溶菌酶测定,除光学法外,尚有琼脂平板鉴定法(Osserman等,1966),据Zucker报道,两法结果一致,相关系数 $r = +0.93$ 。变异系数光学法为11.8%,平板法9.8%。在我国,此法亦被采用。

四、小 结

本文对人血清溶菌酶的光学测定方法的反应温度、时间、菌液浓度、菌液保存时间、血清酶稳定性等影响因素作了部分实验。当菌液透光率在30%左右,菌液2.0毫升,血清0.1毫升,在37℃下反应2分钟,可保持酶浓度与反应速率的直线关系,方法偏差约4%。本法可供临床和预防医学上检验和研究之用。

[本文于1976年4月收到]

雄 性 激 素 对 鹿 茸 生 长 的 作 用

周世朗 吴森章 伍善志

(四川省灌县养鹿场)

鹿茸是珍贵的滋补药品,在自然情况下,公鹿每年的长茸期短,产茸量有限。为了增进人民的健康,以及繁荣对外贸易,支援社会主义革命和建设,需要探索提高鹿茸产量的方法。我们从1973年以来做了雄性激素对鹿茸生长的作用的试验,收到较好的效果。简介于后,以供参考。

材 料 和 方 法

1. 选择体质、体型和产茸量相差甚微(三岔茸的试验组平均鲜重2.48斤,对照组平均鲜重2.69斤;二杠茸试验组平均鲜重1.81斤,对照组

平均鲜重1.78斤)的三岁公鹿24头,将其中长势较好的12头分成收三岔茸的两组:试验组和对照组各6头;长势较差的12头分成收二杠茸的两组:试验组和对照组各6头。试验组在长茸期内定期定量投给小剂量的雄性激素,观察鹿茸的生长情况。

2. 选择年龄相同或相近以及三岔茸鲜重相差不大的黑鹿、杂种鹿和梅花鹿10头,分成试验组和对照组各5头。试验组在再生茸生长的旺盛期内,投给大剂量的雄性激素,观察再生茸的长势情况。

3. 选择体质、体型和产茸量相近(试验组