

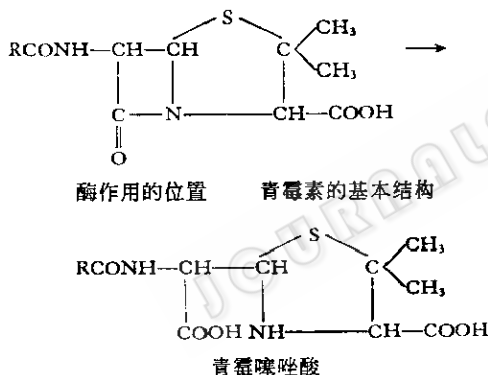
青霉素酶平皿检验的一种改进方法

姜 书 勤 范 云 六

(中国科学院微生物研究所, 北京)

许多细菌产生青霉素酶^[1,2]。在临床上由于某些致病菌产生青霉素酶,使青霉素治疗这些病菌所引起的疾病发生了困难。在青霉素的生产过程中,由于灭菌不严或其它原因,也有可能造成产青霉素酶的杂菌污染,青霉素的产量就会受到影响。

青霉素酶,又称 β -内酰胺酶。使青霉素失效的机理,是由于它将青霉素分子中的 β -内酰胺环水解,形成青霉噻唑酸。其反应式如下:



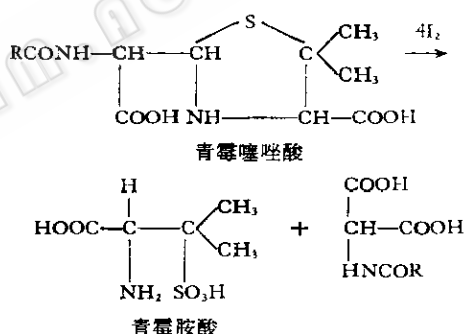
青霉素酶的测定方法有很多种^[3]。在固体培养基上检验青霉素酶*主要有下面三种方法：(1) Andrade 指示剂法^[4]；(2) PNCB**法^[5]；(3) 淀粉-碘法^[6]。在这三种方法中，PNCB 法对于在一个单菌落内分辨产生青霉素酶的和产生青霉素酶的无性繁殖次生菌落 (subclones) 是很好的方法^[7]，而淀粉-碘法对于分辨 penase⁺ 和 penase⁻ 的不同菌落效果最好。这是由于淀粉-碘法的灵敏度高。如果用 Andrade 指示剂法测定时，要青霉素酶的活性在 50 单位/毫克干重才能测出^[1]，PNCB 法对青霉素酶测定的最低浓度为 2 单位/毫克干重^[7]，而利用淀粉-碘法时当青霉素酶的活性少到 0.05 单位/毫克干重也可得出阳性结果^[7]。

我们在研究金黄色葡萄球菌的青霉素酶质体

的遗传工作中,需要从大量的 penase^+ 菌落中检出 penase^- 的菌落。因此,我们利用淀粉-碘法进行测定。在实践中改进了该测定方法,我们以双层琼脂法代替单层琼脂法,并且改在室温下进行测定。经改进后的方法较原方法有如下的优点:

- (1)判断结果准确;
- (2)测定、观察手续方便;
- (3)节省青霉素的用量。

青霉素经青霉素酶水解后产生青霉噻唑酸，碘可使青霉噻唑酸强烈氧化，反应式为：



由于青霉噻唑酸被碘氧化,因此,生长在固体培养基上的菌落,如果产生青霉素酶,那么,当它们接触青霉素与碘液后,便在菌落的四周出现无色透明圈,反之,菌落边缘就不出现透明圈。

改进的青霉素酶平皿检验的具体方法如下:

将 100 毫升 2% 琼脂融化后, 加入 5 毫升 2% 的可溶性淀粉, 使之均匀混合, 在已长好菌落的固体培养基上。轻轻地铺上一薄层 (直径 9 厘米的平皿约用 3 毫升)。冷凝后, 每培养皿中加入 2—3 毫升新配制的碘—青霉素混合液 (碘液由 3.2 M 的碘化钾及 0.08 M 碘配成; 每 100 毫升碘液内加 1 瓶 40 万单位的青霉素 G 钾), 使琼脂层全部被碘—

本文 1974 年 5 月 22 日收到。

* 青霉素胞外酶 penase⁺——青霉素酶阳性
penase⁻——青霉素酶阴性

** *N*-phenyl-1-naphthylamine-azo-o-carboxybenzene 的缩写 (*N*-苯基-1-萘胺偶氮邻苯甲酸)

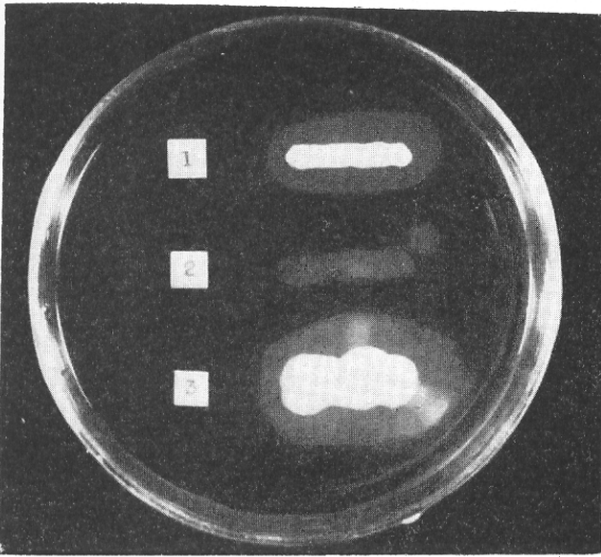


图1 改进的淀粉-碘法测定结果

(1) 金黄色葡萄球菌 S-5 (penase^+); (2) 金黄色葡萄球菌 S-5 (N)(penase^-); (3) 蜡样芽孢杆菌 (penase^+)。

青霉素混合液均匀覆盖。待培养皿中的琼脂层呈深紫色时，立即将多余的碘-青霉素混合液倾去。一般在30分钟左右便可得到清晰明确的结果。 penase^+ 菌落边缘的无色透明圈的大小随时间增长而有所增大，但不产生青霉素酶的菌落始终不退色，不形成无色透明圈。

为了了解本改进方法检验其它产生青霉素酶菌的效果，除金黄色葡萄球菌外，我们还对一些芽孢杆菌如枯草芽孢杆菌、蜡样芽孢杆菌、苏云金芽孢杆菌进行了检验，效果均良好。

图1所示：(1)、(3)分别为金黄色葡萄球菌和蜡样芽孢杆菌的 penase^+ 菌株，在菌的周围形成清晰的透明圈。(2)是金黄色葡萄球菌 penase^- 菌株，在它的周围不形成透明圈，由于菌株不产生青霉素酶，菌落本身也不褪色，因此，从照片中只看到深色的碘液背景下的菌。

测定中应注意的几个问题：

(1) 测定培养皿中的菌落不宜稠密，菌落之间相距最好不小于1厘米，也可以把菌落划种在平皿上。菌龄对于 penase^+ 菌落透明圈的出现时间有影响，一般以菌落产生青霉素酶最高时进行测定为好，我们所用的金黄色葡萄球菌，在18小时左右就可进行测定。

(2) 淀粉琼脂层不宜过厚，要铺平整，否则影响透明圈出现时间。

(3) 青霉素加至碘液中后，须混合均匀，并

应立即进行测定。碘-青霉素混合液加入后，一旦培养基的上层琼脂变为深紫色时，应立即倾去碘-青霉素混合液，否则上层琼脂将变为深褐色，影响 penase^+ 菌落边缘的退色时间。

在我们的工作中也曾试验过滤纸浸湿法^[8]，感到这一方法比较繁琐，不如在固体双层琼脂培养基上直接扩散测定来得简便。我们这一方法与 Baldwin 等^[9]的方法比较，分辨效果更准确些。与淀粉-碘法比较，经过换算可节省青霉素的用量。与 Hennessey 的方法^[10]比较，亦有此优点。按 Hennessey 法测定时，每培养皿要用300毫克青霉素G钾，有时即使在大量青霉素G钾存在的条件下，也并不能得到完全清晰的结果；而现在这个改进方法，125毫克的青霉素G钾供20个培养皿的测定。同时，由于琼脂层与无色透明圈之间的色差很明显，使检查结果更为清晰明确，几乎无误差。

测定后，培养皿中的菌落已失去了存活力。因此，如果需要挑选或保存 penase^+ 或 penase^- 菌落时，须预先进行复制，用其中的一份进行测定。另一份作为继续培养、保存或观察其它特性之用。

生产青霉素的工厂，在生产过程中，如需要检验影响青霉素效价的产青霉素酶的杂菌时，可试用本文所介绍方法测定。

参 考 资 料

- [1] Abraham, E. P.: In "The enzymes" Edited by Sumner, J. B. & K. Myrbäck. 1:1170, 1953.
- [2] Benveniste, R. & Davies, J.: *Ann. Rev. Biochem.* 42:472, 1973.
- [3] Citri, N. & Pollock, M. R., *Advan. Enzymol.* 28:237, 1966.
- [4] Kogut, M., Pollock, M. R. & Tridgell, E. J.: *Biochem. J.*, 62:391, 1956.
- [5] Novick, R. P.: *J. Gen. Microbiol.* 33:121, 1963.
- [6] Perret, C. J.: *Nature* 174:1012, 1954.
- [7] Novick, R. P.: *J. Bact.* 90:467, 1965.
- [8] Foley, J. M. & Perret, C. J.: *Nature* 195:287, 1962.
- [9] Baldwin, J. N., Strickland, R. H. & Cox, M. F.: *Appl. Microbiol.* 18:628, 1969.
- [10] Pearce, L. E. & Meynell, E.: *J. Gen. Microbiol.* 50:173—176, 1968.