

核酸、核酸前体对结核分枝杆菌 H₃₇Ra 和 BCG 生长的影响

匡铁吉 冯 利 王秀莲 张爱萍
(中国人民解放军 309 医院, 北京)

在罗氏培养基中添加嘧啶类化合物或其组合物, 对结核分枝杆菌 H₃₇Ra 和 BCG 菌株有明显的生长促进作用。这种生长促进作用在不利于生长的 pH 条件下更加明显。种子斜面在 4℃ 冰箱贮存的时间越久, 嘧啶类化合物的生长促进作用越明显。鸟嘌呤和鸟嘌呤核苷酸对结核分枝杆菌的早期生长有促进作用。在罗氏培养基中添加 0.3—5 mg/L 的 RNA 或 DNA, 对菌株 H₃₇Ra 和 BCG 的生长无刺激作用。

关键词 结核分枝杆菌; 卡介苗; 嘧啶

本世纪四十年代以来, 相继发现了油酸^[1]、丙酮酸^[2]等物质对结核分枝杆菌的生长有刺激作用。Davies 曾报道, 含有 CO₂ 的环境对结核分枝杆菌的生长有利^[3]。L-天门冬酰胺、L-谷氨酸和 L-天门冬氨酸对结核分枝杆菌生长的促进作用是早在四十年代初确定了的^[4]。作者推测, CO₂、L-天门冬酰胺、L-谷氨酸和 L-天门冬氨酸等具有上述生长促进作用, 可能与细菌细胞内嘧啶、嘌呤等核酸前体物质的合成有关。因此, 进行了核酸类物质对结核分枝杆菌生长的促进作用的研究。

材 料 和 方 法

(一) 菌株

结核分枝杆菌标准人型无毒株 (H₃₇Ra) 和牛型弱毒株 (BCG), 由北京市结核病研究所提供。菌株保存在罗氏斜面上, 4℃ 冰箱贮存。

(二) 培养基

改良罗氏培养基作为试验用基础培养基和对照培养基, 制作方法按《结核病细菌学检验方法暂行规程》。试验培养基是按试验要求在罗氏培养基中补加核苷、核苷酸或核酸等 (表 1)。补加物与培养基中的无机盐组分一起溶解, 然后依照罗

氏培养基制作方法进行配制和灭菌。胸腺嘧啶 (T)、黄嘌呤 (X) 等不溶于水, 可先用少许乙醇

表 1 供试的核酸、核酸前体物及其浓度范围
Table 1 Nucleic acid, nucleic acid precursors and their range of concentration tested

试验物 Compounds tested	浓度范围 (mg/L) Conc range tested
尿嘧啶	1—20
胞嘧啶	1—20
胸腺嘧啶	1—20
乳清酸	1—20
次黄嘌呤	1—20
嘌呤	1—20
黄嘌呤	1—20
腺嘌呤	1—20
鸟嘌呤	1—20
5'-AMP	5—40
ADP	5—20
ATP	5—20
GMP	5—20
RNA	0.3—40
DNA	0.3—80

注: 浓度系指试验培养基的最终浓度。

本文于 1985 年 10 月 4 日收到。

溶解,然后再倾入培养基无机盐组份的溶液中。

培养基 pH: 用 1N HCl 和 10% NaOH, 将培养基基础液的 pH 调至试验值。最终 pH 用酸度计准确测定。本实验的酸性培养基基础液 pH 为 3.6; 碱性培养基基础液的 pH 为 7.6。罗氏培养基基础液的原始 pH 为 5.6。

(三) 接种和培养

种子为罗氏斜面培养物, 37℃ 培养 3 周后取出置 4℃ 冰箱贮存。使用前在 37℃ 活化 48 小时。种子斜面贮存时间不超过一个月。用接种环将斜面上的菌落刮下, 在含 0.2% 吐温 80 的生理盐水中研磨, 制成 1.0mg 湿菌/ml 种子原液。然后依次用生理盐水稀释至 10^{-1} mg/ml。取 10^{-1} mg/ml (大接种量) 和 10^{-2} mg/ml (小接种量) 二管接种, 每支斜面接种 0.1 ml, 置 37℃ 培养。

(四) 结果观察

大接种量(每支斜面接种 10^{-2} mg 菌)第 4 天开始观察结果, 第 4—10 天期间, 每天观察一次。10 天后每二天观察一次, 至罗氏对照培养基上的生长物恒定为止。斜面上的菌落数少于 50 个时要记下个数, 大于 50 个菌用“+”表示。小接种量培养物 12 天开始观察, 二天一次, 记下菌落数及菌落特征。

试验过的核酸类化合物及其浓度范围见表 1。

结 果

(一) 生长促进作用

各种核酸类化合物对结核分枝杆菌菌株 $H_{37}Ra$ 和 BCG 生长的促进作用, 见表 2、表 3。

嘧啶类化合物: 尿嘧啶、胞嘧啶、胸腺嘧啶和乳清酸单独使用, 在 5—20mg/L 范围内, 对菌株 $H_{37}Ra$ 和 BCG 初期生长均有促进作用, 对小接种量初期生长的效果较大接种量为好, 对菌株 BCG 初期生长的刺激作用较 $H_{37}Ra$ 好。胸腺嘧啶对初期生长的促进作用比胞嘧啶和尿嘧啶差。上述四种化合物对二个菌株大接种量后期生

长同样有促进作用。在浓度为 5—20mg/L 范围内, 它们对大接种量后期生长的促进作用随浓度的增加而增加。四种嘧啶类化合物都能促进菌株 BCG 小接种量的后期生长。

在罗氏培养基中补加三种嘧啶(浓度均为 2mg/L、3mg/L 或 5mg/L 时)混合物, 对菌株 $H_{37}Ra$ 和 BCG 的初期生长和后期生长均有明显的促进作用。对小接种量后期生长的促进作用尤为显著, 一般能使菌落数增加一倍左右。三种嘧啶组合物能消除甘油对菌株 BCG 生长的抑制作用。

嘌呤类化合物: 嘌呤、次黄嘌呤、黄嘌呤和腺嘌呤在浓度为 20mg/L 时, 对菌株 $H_{37}Ra$ 和 BCG 的初期生长有抑制作用。在浓度为 5mg/L 时, 对二个菌株的后期生长有益。鸟嘌呤在浓度 20mg/L 时, 对二个菌株小接种量的初期生长有促进作用。在浓度为 5mg/L 时, 鸟嘌呤对菌株 $H_{37}Ra$ 和 BCG 均有生长促进作用, 对菌株 BCG 的生长促进作用更强。

核苷酸: 供试的核苷酸有 AMP、ADP、ATP、GMP。ADP 和 GMP 浓度为 5—20mg/L, 对二个菌株的初期生长有促进作用。四种核苷酸在浓度为 20mg/L 时, 可增加菌株 $H_{37}Ra$ 小接种量斜面上的菌落数, 但出现时间较晚。

核酸: 单独补加 DNA 或 RNA, 浓度为 20—80mg/L, 对菌株 $H_{37}Ra$ 和 BCG 的初期生长有抑制作用, 对大接种量的后期生长有益。如把培养基中 DNA 和 RNA 的浓度降至 0.3—5mg/L, 则无任何促进作用。

组合 DNA(10mg/L) 加 RNA(10mg/L) 对二个菌株大接种量后期生长有利。组合 DNA(80mg/L) 加硫酸铝铵(5g/L) 对菌株 $H_{37}Ra$ 和 BCG 的后期生长有一定的促进作用。试验中发现, 使用刚配制好的

表 2 核酸及其前体物对结核分枝杆菌 $H_{37}Ra$ 生长的作用
Table 2 The effect of nucleic acid and its precursors on the growth of *M. tuberculosis* $H_{37}Ra$

补加物 Addition		浓度 (mg/L) Conc	大接种量培养物 Large inoculum		小接种量培养物 Small inoculum	
			初期生长 Initial growth	后期生长 Late growth	初期生长 Initial growth	后期生长 Late growth
尿嘧啶		15	+	++	+	+
胞嘧啶		15	+	++	+	+
胸腺嘧啶		15	+	+	+	-
乳酸		15	+	+	+	+
鸟嘌呤		5	+	±	+	±
5'-GMP		10	+	-	+	-
ADP		10	+	-	+	±
DNA		50	-	+	-	-
RNA		40	-	+	-	-
组合 (一)	尿嘧啶	5				
	胞嘧啶	5	+	+	+	++
	胸腺嘧啶	5				
组合 (二)	DNA	10	-	+	-	-
	RNA	10				
组合 (三)	DNA	80	-	++	+	+
	硫酸铝铵	5,000				

注: 1. “+”有促进生长作用; “++”促进生长显著; “-”无促进生长作用; “±”有促进生长作用, 但重复性差。
2. 初期生长: 包括最早出现可见菌落的时间和早期生长物的多少。
3. 后期生长: 包括达到最高量生长物的时间和最终生长物的多少。

Notes: 1. In the table + =stimulating growth; ++=stimulating growth significantly; -=No stimulating effect on growth, ±=stimulating growth and showing instability.
2. Initial growth: including the first time arising visible colony and the quantity of the growth in the early stage.
3. Late growth: including the time for achieving the highest yield and the final quantity of the growth.

DNA 溶液制作试验用培养基, 其生长促进作用不好, 需将 DNA 溶液在室温下放置 2 个月再用。

(二) 培养基 pH 与核酸类物质促进生长的效果

培养基的 pH 与核酸类物质促进生长的效果密切相关。若把培养基的基础液 pH 调至 3.6 时, 嘧啶类物质主要是对结核杆菌初期生长有明显的促进作用, 且菌落呈典

型特征。但如将培养基的基础液 pH 调至 7.6 时, 在对照罗氏培养基上, 菌株 BCG 基本上不生长; 在加有三种嘧啶组合物的试验培养基上, 则生长良好。菌株 $H_{37}Ra$ 在基础液 pH 为 7.6 的对照培养基上生长时, 大接种量斜面菌落发生自溶, 而小接种量斜面上无生长。但在培养基中补加三种嘧啶混合物后, 或补加尿嘧啶、胞嘧啶和 GMP 的混合物后, 大接种量生长旺盛, 小接种量

也出现菌落。当培养基的基础液 pH 在 4.6—5.6 之间时, 核酸类物质促进菌株 H₃₇Ra 和 BCG 生长的效果较差。

(三) 菌种冷藏时间与核酸类物质刺激生长的效果

如用 37℃ 培养三周后的罗氏斜面培养物直接作种子, 且不经冰箱贮放, 这时各种核酸类物质对此二株菌只有很弱的生长促进作用。若将同批生长的菌株 H₃₇Ra 或 BCG 斜面培养物, 置 4℃ 冰箱贮放 2、3 和 4 个月后用作种子, 分别接种到含有一种嘧啶碱基或三种嘧啶碱基混合物的培养基上则可以看到, 随着种子斜面在冰箱里贮放时间的延长, 嘧啶碱基及其组合物刺激结核

分枝杆菌生长的效果也更好。以小接种量为例, 使用三种嘧啶组合物的培养基, 接种贮存于冰箱 2、3 和 4 个月的斜面种子, 在培养基上最初出现菌落的天数比对照培养基分别提早 3—5 天, 5—7 天和 7—12 天。

讨 论

1959 年 Darzins 报道, 从菌株 H₃₇Rv 中提取的 DNA, 在浓度为 $2 \times 10^{-4} \mu\text{g/ml}$ 时, 对冰箱贮存三个月的 BCG 菌株有极显著的生长促进作用, 生长加快, 生长期缩短^[5]。1961 年 Darzins 报道, 在罗氏培养基中补加 0.05 $\mu\text{g/ml}$ 的商品 RNA, 可使生长在该培养基上的 BCG 菌株培养物在

表 3 核酸及其前体物对结核分枝杆菌 BCG 生长的作用

Table 3 The effect of nucleic acids and their precursors on the growth of *M. tuberculosis* BCG

补加物 Addition		浓度 (mg/L) Conc	大接种量培养物 Large inoculum		小接种量培养物 Small inoculum	
			初期生长 Initial growth	后期生长 Late growth	初期生长 Initial growth	后期生长 Late growth
尿嘧啶		15	+	+	++	++
胞嘧啶		15	+	+	++	++
胸腺嘧啶		15	+	+	+	+
乳清酸		15	+	+	++	+
鸟嘌呤		5	+	+	+	+
5'-GMP		10	+	+	+	±
ADP		10	+	±	+	+
DNA		50	-	+	-	-
RNA		40	-	+	-	-
组合 (一)	尿嘧啶	5				
	胞嘧啶	5	+	++	++	++
	胸腺嘧啶	5				
组合 (二)	DNA	10				
	RNA	10	-	+	-	-
组合 (三)	DNA	80				
	硫酸铝铵	5,000	-	+	-	++

注: 同表 2。

5℃ 冰箱贮存期间,细胞存活期延长,细胞存活数也增加^[6]。本研究结果表明,使用商品 DNA、RNA,在上述浓度范围内,对菌株 H₃₇Ra 和 BCG 没有明显的生长促进作用。

试验结果表明,嘧啶类化合物及其组合,在试验使用的浓度下,对 H₃₇Ra 和 BCG 菌株生长有明显的促进作用,而且在对生长不利的 pH 条件下表现更为突出。因此,在罗氏培养基中添加嘧啶类化合物,可能提高临床标本中结核分枝杆菌的阳性分离率和缩短出现阳性结果的时间。

1977 年 Harshey 报道,结核分枝杆菌 H₃₇Rv 细胞内 RNA 链合成速度只达到大肠杆菌的 $\frac{1}{10}$ ^[7]。而这是由 H₃₇Rv 细胞内依赖 DNA 的 RNA 聚合酶的性质和数量决定的^[8]。因此,增加细胞内各种核酸前体物质的浓度,以提高 RNA 合成的速度,从而促进细菌生长是有可能的。特别是那些长期贮存在冰箱内的结核分枝杆菌,细胞内核酸前体物质消耗殆尽,合成前体物质的代谢途径处于关闭状态。这时,为了重新生长,吸取外源性核酸前体物质,对细菌的生存和生长都是十分重要的。

本研究结果表明,未经冰箱贮存的结核分枝杆菌,对外源性核酸前体物质没有

明显的需要。而结核分枝杆菌经冰箱贮存 2—4 个月后,它们对核酸前体物质的需要变得十分明显。冰箱贮存时间越久,核酸类物质对进一步培养时的生长促进作用越明显。人们早已知道,生长不良的结核分枝杆菌经传代培养后可变成优良生长的菌型。我们观察到,经冰箱贮放 2—4 个月后的菌株 H₃₇Ra 或 BCG 培养物,重新培养时,在罗氏斜面上生长不佳。因此,我们认为,生长不佳菌和优良生长菌型的差别主要表现在生长早期嘧啶类化合物的合成能力上。这种能力包括对各种原料的利用能力和生物合成的速度。

参 考 文 献

- [1] Dubos, R. J.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **13**: 56—58, 1946.
- [2] Hegny, J.: *Amer. Rev. Resp. Dis.*, **87**: 806, 1963.
- [3] Davies, R.: *Brit. J. Exper. Path.*, **21**(5): 243—253, 1940.
- [4] Long, E. R. (黄绍彪译):《结核病的化学与化学疗法》,上海科学技术出版社,1962.
- [5] Darzins, E.: *Amer. Rev. Resp. Dis.*, **80**: 866—870, 1959.
- [6] Darzins, E. and A. Pukite: *Amer. Rev. Resp. Dis.*, **84**: 549—554, 1961.
- [7] Harshey, R. M. et al.: *J. Bact.*, **129**(2): 616—622, 1977.
- [8] Harshey, R. M. and T. Ramakrishnan: *Biochimica et Biophysica Acta*, **432**: 49—59, 1976.

THE EFFECT OF NUCLEIC ACIDS AND THEIR PRECURSORS ON THE GROWTH OF *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* H₃₇Ra AND BCG

Kuang Tieji Feng Li Wang Xiulian Zhang Aiping

(No. 309 Hospital of the People's Liberation Army, Beijing)

Addition of pyrimidines or their combinations to modified Löwenstein-Jensen medium stimulated obviously the growth of *Mycobacterium* H₃₇Ra and BCG. Such growth-promoting action is more powerful when the pH value of the medium is not suitable for the growth. When the slants used for inoculation were stored in a refrigerator at 4°C, the longer the time kept in the refrigerator, the more obvious growth-promoting effect of the compounds of pyrimidines on the growth appear-

ed. Guanine and guanic acid were found to promote the initial growth of tuberculosis bacillus. When DNA and RNA were added in concentrations ranged from 0.3 mg/L to 5 mg/L in the medium, there was no growth-stimulating action on the H₃₇Ra and BCG.

Key words

Mycobacterium tuberculosis; BCG; Pyrimidines