

# 一种简单快捷的改良 V-P、MR 试验方法

黄翠姬\* 刘昭明

(广西工学院生物与化学工程系 柳州 545006)

**摘要** 在白瓷板上进行 V-P 试验,结果表明,用白瓷板法只需加几滴培养液后静置等待结果出现即可,与传统的试管法比较更为简单方便,试验结果更为直观和科学。而且,进行 V-P 试验时可以方便地同时在白瓷板上做 MR 试验。

**关键词** :V-P 试验,MR 试验,快捷,细菌,方法

**中图分类号** :Q93 **文献标识码** :A **文章编号** :0253-2654(2007)03-0553-04

## An Improved Simple and Quick Method for V-P and MR Tests

HUANG Cui-Ji LIU Zhao-Ming

(Department of Biological and Chemical Engineering, Guangxi University of Technology, Liuzhou, Guangxi 545006)

**Abstract** V-P and MR tests were done at the same time using white porcelain board. The results showed that the white porcelain method was simple and convenient compared to the traditional method.

**Key words** :Bacteria, V-P test, MR test, Quick, Method

V-P(乙酰甲基甲醇试验)和 MR(甲基红)试验是鉴定细菌常用的生理生化反应试验,目的是检验某些细菌利用葡萄糖的能力。V-P 试验常用的方法是在试管培养液中直接加入一定量的 40% KOH 和 5%  $\alpha$ -萘酚乙醇溶液,或取少量培养液放到另一空试管中再加入少量的 40% KOH 和 5%  $\alpha$ -萘酚乙醇溶液,用力振荡至结果出现。但是,此法存在着试验准备工作量大,操作相对复杂,结果不容易获得等缺点,而传统的 MR 试验方法是在试管培养液中直接滴加甲基红指示剂,由于两个试验的结果存在着一定的关系,为了使 V-P 和 MR 试验更加简单方便,两者的结果对照更加明显,在教学实践中将传统的试管操作改良为白瓷板操作,将原来分开在两支试管中进行的两个试验同时在白瓷板进行,经过 5 届学生的试验结果表明,效果很好。现将改良后的 V-P 和 MR 试验技术介绍如下。

## 1 实验原理

### 1.1 V-P 试验

V-P 试验用来测定某些细菌利用葡萄糖产生非

酸性或中性末端产物的能力。某些细菌分解葡萄糖产生丙酮酸,再将丙酮酸缩合脱羧成乙酰甲基甲醇(亦称三羧基丁酮)。乙酰甲基甲醇在碱性条件下,被空气中的氧气氧化成二乙酰,二乙酰再与蛋白质中的精氨酸的胍基(若培养基中的胍基太少,可加少量肌酸等胍基化合物)起作用生成红色化合物,此为 V-P 反应阳性,加入  $\alpha$ -萘酚可促进反应出现。其反应过程如图 1 所示。

### 1.2 MR 试验

MR 试验是用来检测细菌利用葡萄糖产酸能力的强弱。有些细菌(如大肠杆菌)能将葡萄糖分解为丙酮酸,丙酮酸再被分解为甲酸、乙酸、乳酸等,pH 值降到 4.2 或更低,酸的产生可由甲基红指示剂的变色显示[pH4.2(红色)~6.3(黄色)],细菌分解葡萄糖产酸,则培养液由原来的桔黄色变为红色,此为 MR 试验阳性,MR 试验阴性的细菌将产生的酸进一步代谢,生成非酸性末端产物,使 pH 值升至大约 6,此时加入甲基红指示剂,培养基呈现黄色。

\* 通讯作者 Tel 0772-2687033, E-mail: cuijihuang@yahoo.com.cn

收稿日期:2006-06-06,修回日期:2006-10-08

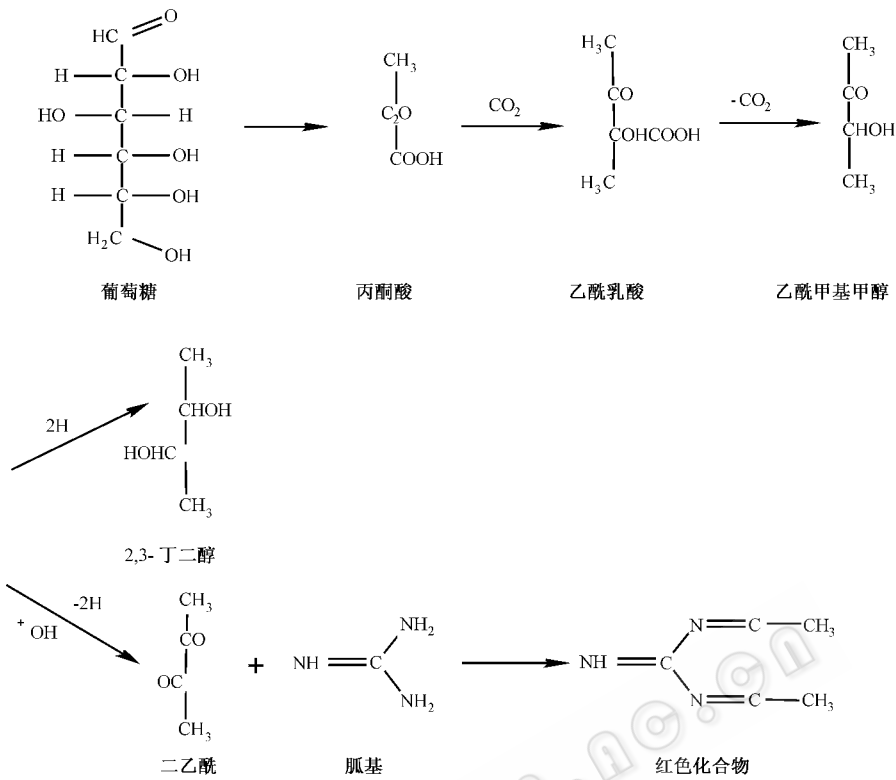


图1 V-P反应过程

## 2 实验器材

### 2.1 菌种

大肠杆菌(*Escherichia coli*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)。

### 2.2 培养基

葡萄糖蛋白胨水。

### 2.3 试剂

40% KOH、5% α-萘酚乙醇溶液、甲基红指示剂。

### 2.4 主要器具

恒温培养箱、水浴锅、接种环、试管、白瓷板。

## 3 实验方法

### 3.1 接种与培养

分别接种大肠杆菌和枯草杆菌于装有葡萄糖蛋白胨水(约 5mL)的试管中,和空白对照培养基试管一起置于 37℃ 恒温培养箱中培养 48h。

### 3.2 试验方法

**3.2.1 V-P 试验** :分别按下述操作方法进行 V-P 试验,传统的试管法:

(1)取出培养好的试管,在培养基中加入 40%

KOH 溶液 10 滴~20 滴,再加入等量的 5% α-萘酚乙醇溶液,拔去棉塞,用力振荡直至枯草杆菌培养液出现红色。

(2)操作同前,加入试剂混匀后放入 37℃ 恒温箱中保温 20min~30min 后取出振荡直至枯草杆菌培养液出现红色。

(3)操作同前,加入试剂混匀后放入沸水浴 1min~2min 后取出振荡直至枯草杆菌培养液出现红色。

(4)取少量(1mL)培养液与另一空试管中,加入等量的 40% KOH 溶液和 5% α-萘酚乙醇溶液,猛烈振荡直至枯草杆菌培养液出现红色。

(5)操作同方法(4),加入试剂混匀后放入沸水浴 10s~30s 后取出振荡直至枯草杆菌培养液出现红色。

改良后的白瓷板法:

(6)取 3 滴培养液于白瓷板中,加入 2 滴 40% KOH 溶液和 1 滴 5% α-萘酚乙醇溶液,轻轻摇晃白瓷板使其混匀后,室温下静置直至枯草杆菌培养液出现红色。

3.2.2 MR 试验 :在做 V-P 试验的同时 取相应的几滴培养液于同一白瓷板上 ,分别加入 1 滴甲基红指示剂 ,即可出现结果。

4 结果与讨论

不同 V-P 试验方法的效果比较见表 1。

表 1 不同 V-P 试验方法的效果比较

方法	所需培养液的量	所需试剂量*	沸水浴时间 ( min )	37℃ 保温时间 ( min )	振荡时间 ( min )	红色出现时间 ( min )	辅助器材
1	5mL	①10~20 滴 ②10~20 滴	/	/	20~30	20~30	/
2	5mL	①10~20 滴 ②10~20 滴	/	20~30	1	20~30	恒温箱
3	5mL	①10~20 滴 ②10~20 滴	1~2	/	1~2	2~4	水浴锅
4	1mL	①10 滴 ②10 滴	/	/	10~15	10~15	空试管、吸管
5	1mL	①10 滴 ②10 滴	0.2~0.5	/	1~2	2~3	空试管、吸管、水浴锅
6	3 滴	①2 滴 ②1 滴	/	/	/	10~15	白瓷板、吸管

注 ① 40% KOH 溶液 ② 5% α-萘酚乙醇溶液

从 V-P 试验不同方法及结果可以看出 ,采用方法 1、2、3 所消耗的培养液和相应的试剂比较多 ,而且由于试管内的液体较多 ,很难振荡均匀 ,与氧气接触较少 ,在室温下反应较慢 ,方法 1、2、4 所需时间较长 ,方法 4、5 所需试剂较少 ,方法 3 和 5 振荡时间和整个反应时间都较短 ,但在沸水浴中的时间要掌握得合适 ,若沸水浴时间太短则振荡的时间就长 ,时间太长培养液颜色加深 ,红色不出现 ,导致试验失败。试验失败的原因可能是因时间太长 ,温度太高 ,一些参与或促进红色化合物形成的物质受到破坏造成的 ,相比之下改良后的白瓷板法由于培养液用量少且直接暴露在空气中 ,能与氧气充分接触 ,无须振荡 ,反应充分 ,操作更为简单 ,无特殊技术要求 ,试验结果很明显 ,在等待结果出来的同时可进行其它试验项目 ,节约时间。

通过试验的效果对比表明 ,采用改良后的白瓷板法具有如下优点 :

(1) 操作方法简易 :只需在白瓷板上滴加培养液和试剂轻轻摇晃混匀即可 ,不需用力振荡混匀和另外培养或进行沸水浴 ,操作简单且容易获得结果。

(2) 在同一白瓷板上同时进行甲基红( MR )试验 ,试验结果更为直观科学 :由于 MR 试验和 V-P 试

验的所用培养基都为葡萄糖蛋白胨水 ,目的都是检验细菌利用葡萄糖的能力。一般情况下 ,如果某一细菌 V-P 试验为阳性者 ,MR 试验应为阴性 ,反之亦然(但也有例外 ,如肠杆菌科的蜂房哈夫尼亚菌和奇异变形杆菌的 V-P 试验和 MR 试验常同为阳性) ,这样的结果需要 4d 甚至更长的培养时间。如果取同一支培养液在同一白瓷板上同时进行这两项试验 ,待测细菌培养 48h 后 ,V-P 试验结果为阴性的细菌如大肠杆菌 ,在其培养液中滴加甲基红指示剂通常呈鲜红色 ,而 V-P 试验结果为阳性的细菌如枯草杆菌 ,往其培养液中滴加甲基红指示剂通常会呈现橘红色 ,这可以说明枯草杆菌能利用葡萄糖产生的丙酮酸生成中性的乙酰甲基甲醇 ,只是在 48h 的培养时间内 ,枯草杆菌未能把分解葡萄糖所产生的丙酮酸全部利用完 ,培养液中仍然存在少量丙酮酸 ,培养液仍呈弱酸性。在白瓷板上同时进行 MR 试验和 V-P 试验 ,由于白色作为背景 ,只需少量的培养液和试剂 V-P 和 MR 试验结果的颜色都可以很清晰地反应出来 ,试验效果见图 2。

从试验效果图可以清楚地看到 ,V-P 试验中 ,枯草杆菌培养液最终为红色 ,为阳性反应 ,其 MR 试验的现象是培养液呈橘红色 ,为弱阳性反应 ,而大肠杆菌在 V-P 试验中其结果与空白对照一样 ,无红色

出现,其 MR 试验的现象是培养液呈鲜红色,为强阳性反应,因此在同一白瓷板上同时进行这两个试验,结果的对比非常的明显,能更好地反映出两个试验结果之间的关系。

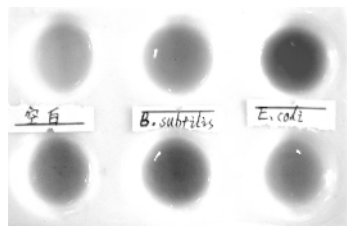


图 2 白瓷板法试验效果

(白瓷板的上一排是 MR 试验结果,下一排为 V-P 试验结果,从左到右依次为空白对照 枯草杆菌和大肠杆菌)

(3)降低实验准备强度和实验成本:如果本试验是由实验技术人员负责准备好培养液,学生只做结果观察时的操作,使用试管法,按每个实验班 30 人,每两人 1 组计算,做 V-P 试验,实验员至少需接种 15 支大肠杆菌和 15 支枯草杆菌及准备 15 支空

白对照液,用方法 1、2、3 要使用较多的试剂,而用方法 4、5 虽然可减少试剂用量,但必须每组另配 3 支空试管,而使用白瓷板法每种细菌只需要两支培养液可供全班同学完成此项实验,同时还可以完成 MR 试验,可大大降低实验准备的强度,有助于降低实验成本。

## 5 结论

在白瓷板上进行 V-P 试验,与传统的试管法相比较操作简单方便,试验结果更为直观和科学,而且,进行 V-P 试验时可以方便地同时也在白瓷板上做 MR 试验,降低实验准备强度和实验成本。

## 参考文献

- [1] 杜连祥,路福平主编.微生物学实验技术.北京:中国轻工业出版社 2005.p.8.
- [2] 陈金春,陈国强主编.微生物学实验指导.北京:清华大学出版社 2005.p.8.