

酶测定在微生物快速鉴定中的应用*

蔡芷荷 吴清平** 钟前林 苏 健

(广东省微生物研究所 广东省菌种保藏与应用重点实验室 广州 510070)

摘要: 利用微生物代谢酶的测定对微生物进行快速鉴定具有简便、快速、直观等优点, 其应用主要有 3 种方式: 微生物快速鉴定系统、利用微生物特征性酶直接进行快速鉴定和利用含特征性酶底物的培养基进行快速分离鉴定。

关键词: 酶测定, 快速鉴定, 色原 (荧光) 底物

中图分类号: Q 939 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2004) 04-0097-04

微生物的鉴定是基于微生物特征的多样性, 包括形态、生长、抗药性、代谢、生化、遗传等因素。经典的方法是从选择性培养基中分离出纯菌落, 然后进行多项生化试验: 如糖类、氨基酸代谢、碳氮源利用和酶类、抑菌试验等, 有些还需进一步做抗原分析。仅生化反应至少需要 1 d 时间, 有些更长达 7 d。食品、环境、临床样品的鉴定工作关键在于易于操作及快速得出结果, 传统鉴定方法费时费工, 阻碍了鉴定工作的进展。目前鉴定方法趋向于用阻抗法、酶联免疫、乳胶凝集、核酸杂交、聚合酶链反应等快速方法, 但有些方法与传统方法比较还存在着检测灵敏度或准确度不够等缺陷, 致使应用受到限制。而微生物代谢酶的测定通常得到与传统鉴定方法比较一致的结果, 因为许多酶是微生物固有的或易于诱导的, 而且一般培养数分钟至 3 h 就可以测到, 因此酶测定可提供简单而快速的鉴定结果^[1,2]。目前酶测定应用于微生物快速鉴定的主要方式有: 微生物快速鉴定系统、利用微生物特征性酶直接进行快速鉴定和利用含特征性酶底物的培养基进行快速分离鉴定。

1 酶测定在微生物鉴定系统的应用

1.1 原理 在鉴定系统的培养基中分别加入某种色原或荧光合成底物, 该底物是由需测定的酶底物与色原或荧光物质合成, 代替了传统的糖类、氨基酸等。此底物无色, 经微生物胞内或胞外酶的作用而释放出色原 (呈各种颜色) 或荧光。反应简式如下: 色原 (荧光) 糖苷结合物 + 糖苷酶 → 糖苷 + 色原 (荧光); 色原 (荧光) 氨基酸结合物 + 氨基肽酶 → 氨基酸 + 色原 (荧光)。大多数的色原为酚的衍生物, 主要有 α 、 β 萘酚、邻位或对位硝基酚 (PNP)、对硝基苯胺 (PNA)、酚酞、2 氯 4 硝基苯 (CNP), 而荧光物主要是香豆素的衍生物, 如 4-甲基伞型酮^[2~4]。

1.2 鉴定方法 其操作方法与传统的生化试验差异不大。即用无菌生理盐水稀释菌液至一定浓度, 加入至含色原 (荧光) 底物的培养基反应系统中, 在一定的温度和时间培养, 然后观察是否产生特定的颜色或荧光以判断其阴阳性。所得结果通过电脑检索或直接查索引表便可得出鉴定结果^[4]。

* 广东省科技攻关项目资助 (No.20012013)

** 联系人 Tel: 87668132 E-mail: wuqp@gis.sti.gd.cn

收稿日期: 2003-09-01, 修回日期: 2003-11-23

1.3 特点 鉴定所需时间短、准确率高。用 Micro-ID System 作鉴定 4h 可得到结果。Dade MicroScan Rapid Identification Systems 中的革兰氏阴性杆菌和革兰氏阳性杆菌鉴定是最快的鉴定系统, 2~2.5 h 便能以荧光反应测出活性酶, 并且准确率相当高。Achondo 等人用 MicroScan 中的 RNID3 系统鉴定包括 138 株发酵和非发酵革兰氏阴性菌的 4151 株菌种, 准确率分别达到 98.4% 和 92.5%^[1,4]。

1.4 种类 商品化的各菌属细菌鉴定装置, 一次可做 10~40 项试验。Micro-ID 包括肠杆菌科在内的临床革兰氏阴性杆菌鉴定系统中, 包含了半乳糖苷酶、细胞色素氧化酶、赖氨酸和鸟氨酸脱羧酶、色氨酸脱氨酶、以及脲酶等的测定。而 API enzyme research kits 中包括了 20 种糖苷酶、10 种酯酶、57 种芳基胺酶、酸性和碱性磷酸酶、及磷酸酰胺酶的测定^[1]。

2 利用微生物特征性酶直接进行快速鉴定

2.1 原理 现已发现多种微生物具有特征性酶, 应用适当的色原(荧光)底物测定该酶, 可迅速且简易完成微生物的鉴定。

2.2 测定方法 (1) 酶分析: 取出一定量培养好的菌液, 加入适量的色原(荧光)底物及辅酶因子等试剂, 或者直接将色原(荧光)底物加入培养基中, 培养后取出菌液进行分析, 在一定波长下用荧光计分析荧光, 或用分光光度计分析色原^[5]。(2) 酶定性测定: 用荧光底物制成溶液, 滴加至平板培养基中的单菌落上, 在一定波长的紫外光下观察菌落或周围培养基的荧光; 或用纸片浸吸色原底物, 纸片经脱水后与菌液反应, 然后肉眼观察纸片颜色的变化^[6]。

2.3 特点 鉴定时间非常短, 定性测定在几分钟至几十分钟就可完成鉴定。操作也相当简单, 一般只需做一至两种酶的测定就可得出结果, 而传统的鉴定需做多种生化试验。

酶的测定在微生物鉴定中存在假阴性和假阳性问题。1976 年, Killun 和 Bulow 报道了 97% 的大肠埃希氏菌含有 β -葡糖苷酸酶, 约 10% 的沙门氏菌属中一些菌也含有此酶^[7]。而孙家莉等检测了大肠杆菌的近缘菌如某些产气肠杆菌和阴沟肠杆菌也具有此酶, 在他们测定的 138 株大肠埃希氏菌和 190 株其他菌株中, 敏感性为 94.2%, 特异性为 92.6%^[7]。

2.4 种类 已发现的微生物特征性酶有多种, 如大肠杆菌具有 β -葡糖醛酸苷酶、大肠菌群具有 β -半乳糖苷酸酶、沙门氏菌具有辛酸酯酶, 金黄色葡萄球菌具有 β -N-乙酰葡萄糖胺酶、单核增生李斯特菌具有丙氨酸氨肽酶、白色念珠菌具脯氨酸氨肽酶及 N-乙酰 β -D 半乳糖苷酶、克柔念珠菌具酸性磷酸酶、热带念珠菌具吡咯磷酸酶、难辨梭菌具 L-脯氨酸氨肽酶等^[6,8,9]。

3 利用含特征性酶底物的培养基进行快速分离鉴定

3.1 原理 将特定的色原(荧光)底物添加至合适的选择性培养基中, 使选择性培养与特征性酶测定结合起来。

3.2 测定方法 一种方法是将色原(荧光)底物添加至选择性增菌培养基中, 再加入

样品, 在特定的温度下培养, 然后在紫外光下观察荧光或直接用肉眼观察颜色; 另一种方法是将色原(荧光)底物添加至选择性琼脂培养基中, 并从选择性增菌培养基中取出菌液, 在含底物的选择性琼脂培养基上划线分离, 或直接取样品在平板上涂布分离或倾注平板, 在特定温度下培养一定时间后, 观察菌落的荧光或颜色^[7,10]。

3.3 特点 将鉴定结合到选择性培养中, 与传统方法比较减少了生化试验这一鉴定步骤, 最大程度地缩短了时间, 一般培养时间在 24 ~ 48 h, 与普通选择性分离培养无差异, 而且非常直观, 易于判断^[10]。

由于荧光反应的敏感度较颜色反应强千万倍, 因而荧光底物通常用于液体培养基中。但如果荧光底物用在琼脂培养基中, 荧光会扩散至整个平板表面, 不利于判断。而色原底物与酶反应后, 菌落呈现鲜艳颜色, 不需借助紫外光就能辨别, 而且可以定量检测, 因而色原底物通常用于琼脂培养基中^[2]。

不是所有具特征性酶的微生物均在含底物的培养基中显阳性反应。Martins 等人用 DNA-DNA 分子杂交技术检测 435 株大肠埃希氏菌, 测出 97.7% 的大肠埃希氏菌含有编码 β -葡萄糖醛酸苷酶的 *uidA* 基因, 而只有 92.4% 的菌株在含有 4-甲基伞型酮- β -D 葡萄糖醛酸苷 (MUG) 的培养基中呈阳性反应^[11]。

虽然微生物特征性酶较为单一, 但测定同一种酶的合成色原(荧光)底物却有多种, 而且不同底物在培养过程中表现也不一致。如乙基 7-羟基香豆素-3-羧酸盐- β -D 半乳糖苷 (EHC-GAL) 在荧光法中测定大肠菌群中的 β -半乳糖苷酸酶, 效果优于 4-甲基伞型酮- β -D 半乳糖苷 (MUGAL), 其原因是 MUGAL 对细菌生长具有抑制性^[3]。Kristen 指出培养基中乳糖抑制 MUG 反应^[12]。在检测大肠菌群的显色培养法中, 当以 cyclohexenonesculetin- β -D 半乳糖苷 (CHE-GAL) 作底物时, 灵敏度较低, 而且这个培养基需加入铁离子, 阳性反应出现不可溶的黑色螯合物, 当同时存在某些菌具有脱氢酶活性而产生颜色时, 则干扰了结果的观察。而 p-萘酚苯- β -D 半乳糖苷 (PNB-GAL) 灵敏度较高, 只需用 CHE-GAL 1/15 的用量或 5-溴-4-氯-3-吡啶- β -D 半乳糖苷 (X-GAL) 1/4 用量就能检测大肠菌群^[13]。有关各种含特征性酶底物的培养基的敏感性与特异性也有许多报道^[9,13,14]。

3.4 种类 目前以荧光或显色培养基分离和鉴定的主要致病菌有大肠杆菌、大肠菌群、沙门氏菌、大肠杆菌 O157、金黄色葡萄球菌、单核增生李斯特菌、霍乱弧菌、副溶血弧菌、主要致病性念珠菌及常见尿道病原菌等。其中大肠杆菌和大肠菌群相关的报道最早, 应用也较成熟。

4 结束语

酶测定在微生物分离鉴定中具有简便、快速、直观以及较高的敏感性和特异性等优点, 目前是国外鉴定应用的热点。但酶测定仍存在若干问题, 如色原(荧光)底物存在灵敏度问题, 以及底物对微生物本身或培养基中各组份之间可能存在抑制、干扰作用, 另外有些培养基中原材料含有待测酶, 或某些菌自身发光等, 均可能影响结果的判断^[2,15]。目前已发现的酶种类比较少, 未能满足致病菌的检测。而药典、国家标准中涉及利用特征性酶快速鉴定的只有大肠杆菌和大肠菌群两项, 基于利用酶测定进行

快速鉴定的多种优点, 如果酶测定的研究能够确立更多的酶种类, 合成更灵敏的复合底物, 建立和完善快速检测方法, 使致病菌的鉴定达到快速、准确的结果, 则该项技术在食品、环境、临床等领域具有更广阔的应用前景。

参考文献

- [1] Shoshana B, Mammad M. Clin Microbio Rev, 1998, 11 (2): 318 ~ 340.
- [2] Erne de Boer, Rijkelt R. Int J Food Microbiol, 1999, 50: 119 ~ 130.
- [3] Chilvers K, Perry J, James A, *et al.* J Appl Microbiol, 2001, 91 (6): 1118 ~ 1130.
- [4] 陈天寿. 微生物培养基的制造与应用. 北京: 中国农业出版社, 1995.
- [5] Vanpourke S, Nelis H. Appl Environ Microbiol, 1995, 61 (12): 4505 ~ 4509.
- [6] Freydere A, Gille Y. J Clin Microbiol, 1991, 29 (10): 2357 ~ 2359.
- [7] 孙家莉, 米 沙, 刘晓兰, 等. 中华检验医学杂志, 2001, 24 (3): 168 ~ 170.
- [8] Tryland I, Fiksdal L. Appl Environ Microbiol, 1998, 64 (3): 1018 ~ 1023.
- [9] 张军民, 周贵民. 中华医学检验杂志, 1998, 21 (6): 325 ~ 327.
- [10] 苏德模, 徐维洁, 刘 鹏, 等. 药物分析杂志, 1996, 16 (2): 108 ~ 111.
- [11] Martins M, Rivera I, Clark D, *et al.* Appl Environ Microbiol, 1993, 59 (7): 2271 ~ 2276.
- [12] Brenner K, Clifford C, Yvette R, *et al.* Appl Environ Microbiol, 1993, 59 (11): 3534 ~ 3544.
- [13] Cassar R, Cuschieri P. J Clin Microbiol, 2003, 41 (7): 3229 ~ 3232.
- [14] Langlet S, Quentin G, Contant G, *et al.* Ann Biol Clin (Paris), 1999, 57 (2): 191 ~ 196.
- [15] James A, Chilvers K, Perry J, *et al.* Appl Environ Microbiol, 2000, 66 (12): 5521 ~ 5523.