

# 用平板法检测产酶菌株

徐定邦 李文通

(上海新型发酵厂, 上海)

在微生物学理论和应用研究中, 常常需要筛选产生或不再产生某种酶的菌株。平板培养基检测法在初筛菌株时较为简便和快速。近年来, 除原有的透明圈法仍广为采用外, 利用类似酶的组织化学定位的显色反应法在遗传育种工作中近来也采用得很多。还有一些利用酶促反应产物的特征, 在平板上进行检测的方法。本文拟根据部分文献报道作一综合简介。

## 透 明 圈 法

在培养基中加入某特定底物, 由平板上菌落周围是否出现透明圈, 可以检测菌株是否产生某种特定的酶。这类方法多用于检测大分子

水解酶, 例如核酸、蛋白质、脂类、淀粉、纤维素、葡聚糖、果胶、木聚糖、几丁质、透明质酸、硫酸软骨素等的水解酶类, 都可以用这种方法检测某菌株能否产生。Omenn 等<sup>[1]</sup>用这种方法曾从成万株葡萄球菌中得到缺失脱氧核糖核酸酶的 40 株突变株, Montencourt 等<sup>[2]</sup>曾用此法筛选出高产纤维素酶的突变株。

Cronett 等<sup>[3]</sup>在培养基中加入粪链球菌或小球菌细胞来检测产溶菌酶的菌株, 产溶菌酶的菌落周围即出现透明圈。

为了使透明圈更明显, 可以用一些方法处理长好菌落的平板。如用 1 N 盐酸溶液浸润含核酸钠盐底物的平板, 用蛋白质沉淀剂处理检

测蛋白质水解酶的平板,用乙醇处理含淀粉底物的平板等。还可以在平板中加入带色的底物,使反差更为明显。

当以水溶性的 Tween 20 为脂肪酶的底物,用平板法检测产脂肪酶菌株时,在产酶菌落周围形成月桂酸沉淀,这时在透明背景上出现混浊圈<sup>[4]</sup>,原理与透明圈法是相同的。

## 显 色 法

利用酶反应产物与某种染料反应,或利用某种特定的指示剂,在平板上检测产生或不产生某种酶的菌株,近来在微生物遗传育种研究工作中应用得很多,现分述如下。

### 一、利用萘酚、萘胺及其衍生物的显色反应

游离萘酚等与重氮化合物可形成不溶性染料,利用这一反应可在平板上检测产生各种磷酸酯酶、酯酶、氨基肽酶等的菌株。如 Toh-E<sup>[5]</sup>等在长有菌落的平板上复以含 0.5%  $\alpha$ -萘酚磷酸酯、5% Fast Blue B 的 0.5M 乙酸缓冲液(pH 4.0)琼脂层,培养 30—60 分钟后,产酸性磷酸酯酶的啤酒酵母菌落周围,因有  $\alpha$ -萘酚游离而与染料形成暗红色,不产该酶的菌落周围则成白色。Higerd<sup>[6]</sup>曾用类似的方法从 3500 个菌落中得到 4 株缺失酯酶的突变株,并用这些突变株分析了酯酶与芽孢形成的关系;Heiman 等<sup>[7]</sup>曾用类似的方法检测出沙门氏菌蛋白酶 II,他们采用了 1% 的  $\alpha$ -N-甲基- $\alpha$ -N-甲苯对磺酰赖氨酸- $\beta$  萘酯作底物,用其它底物都不能得到满意的结果。

### 二、利用硝基苯酚或硝基苯胺的显色反应

游离的硝基苯酚或硝基苯胺呈黄色,在平板法中,可用于检测产生各种糖苷酶、磷酸酯或氨基肽酶的菌株。

Hayward<sup>[8]</sup>将大肠杆菌培养于不含诱导物的琼脂平板上,在此平板上喷洒邻硝基苯酚  $\beta$ -半乳糖苷作为底物,则  $\beta$ -半乳糖苷酶组成型突变株可使该底物水解而释放游离的硝基苯酚,在菌落周围呈现黄色。用类似的底物还可以检测菌株是否产生葡萄糖苷酶、葡糖酸苷酶、木糖苷酶和岩藻糖苷酶等。

Cerny<sup>[9,10]</sup>用含 4% 的 L-丙氨酸-4-硝基苯胺的 Tris-顺丁烯二酸缓冲液(pH 7.0)浸润滤纸,然后覆盖于长有菌落的培养皿上,5 分钟后,产生氨基肽酶的菌落能水解 L-丙氨酸-4-硝基苯胺,释放出游离硝基苯胺而显黄色。由于滤纸本身呈白色,所以反差明显,比在平板上喷洒底物更好。由于典型的革兰氏阴性细菌都产生氨基肽酶,而阳性菌不产生或活性很弱,所以可用此方法方便地区分革兰氏阳性和阴性细菌。

### 三、利用吲哚及其衍生物的显色反应

游离吲哚可以自动被氧化为靛蓝,利用这一反应可在平板上检测磷酸酯酶和脂肪酶。Hageman<sup>[11]</sup>在长好芽孢杆菌菌落的平板上,复以内含吲哚乙酸酯的琼脂层,能分泌有解酯活力的酶的菌落周围即显蓝色。

### 四、利用 5-巯基-2-硝基苯甲酸的显色反应

某些微生物产生的蛋白酶能水解氨基酸苯酯, Hageman<sup>[11]</sup>在长好枯草芽孢杆菌的平板上覆盖含有 N-苯酰酪氨酸硫代苯酯和 5,5'-二巯基双(2-硝基苯甲酸)(DTNB)的琼脂层,当苯酯被蛋白酶水解释放出苯硫酚后,即可还原 DTNB 而释放出强烈显色的 5-巯基-2-硝基苯甲酸,从而可以检测不产该种蛋白酶的枯草杆菌突变株。

### 五、三苯基四氮唑盐酸盐平板

三苯基四氮唑盐酸盐(TTC)是一种无色化合物,易溶于水和渗入细胞组织,被还原后形成不溶于水的红色甲臍。

Bochner 等<sup>[12]</sup>在一种含有 0.7%  $K_2HPO_4$  和 0.3%  $KH_2PO_4$ , 具有较强缓冲力的平板中加入 0.2% 蛋白胨, 0.1—1.0% 的碳源和 0.0025% TTC, 在这种平板上,野生型菌株能迅速利用碳源,菌体的电子传递系统活跃,因而 TTC 被还原。菌落呈红色;而不能利用该种碳源的突变株,电子传递系统功能微弱,所以 TTC 不被还原而菌落呈白色。利用这种方法可在平板上检测缺失各种酶的大肠杆菌、沙门氏菌和酵母菌突变株。利用这种方法还可以检测双重或多重营养缺陷型菌种。

(下转第 194 页)

(上接第 197 页)

## 六、利用其它显色反应

在平板上复以一层含 Benzyl viologen 和甲酸钠的琼脂层,产甲酸脱氢酶菌落即呈紫色,不产酶的菌落呈白色<sup>[13]</sup>。用酚酞二磷酸酯作底物,当菌落长出后,将平板置于含氨水的容器上,产生磷酸酯酶的菌落因能分解出酚酞而呈红色<sup>[14]</sup>。在平板上喷洒 1% 的  $H_2O_2$  和 1% 甲氧基苯胺,产过氧化物酶的菌落呈红棕色<sup>[15]</sup>。在含有乳酸钠- $KNO_3$  的平板上,复以含磺胺-N-1-萘乙二胺,具有依赖乳酸的硝酸还原酶的菌落,因为会产生  $NO_2^-$  而显红色<sup>[16]</sup>。

此外,Levine<sup>[17]</sup> 用镍针蘸取 30% 的  $H_2O_2$  与平板上菌落边缘相接触,产过氧化氢酶菌落则产生气泡。用这种方法试验了 5000 个鼠伤寒沙门氏菌的菌落,获得了 5 株缺失过氧化氢酶的突变株。这是另一类型的平板检测法。

## 参 考 文 献

[1] Omenn, G. S. and J. Friedman: *J. Bact.*, **101**: 921, 1970.

- [2] Montencourt, B. S. and D. E. Eveleigh: *Appl. Environ. Microbiol.*, **34**: 777, 1977.
- [3] Cronett, J. B., B. E. Redman and G. D. Shockman: *J. Bact.*, **133**: 631, 1978.
- [4] Hankin, L. and S. L. Anagnostakis: *Mycologia*, **67**: 597, 1975.
- [5] Toh-E, A., Y. Ueda, S-I. Kakimoto et al.: *J. Bact.*, **113**: 727, 1973.
- [6] Higerd, T. B.: *J. Bact.*, **129**, 973, 1977.
- [7] Heiman, C. and C. G. Miller: *J. Bact.*, **135**: 588, 1978.
- [8] Hayward, A. C.: *J. Appl. Bact.*, **43**: 407, 1977.
- [9] Cerny, G.: *Eur. J. Appl. Microbiol.*, **3**: 223, 1976.
- [10] Cerny, G.: *ibid*, **5**: 113, 1978.
- [11] Hageman, J. H. and B. C. Carlson: *J. Bact.*, **114**: 612, 1973.
- [12] Bochner, B. R. and M. A. Savageau: *Appl. Environ. Microbiol.*, **33**: 434, 1977.
- [13] Michael, Y. K. and B. A. Haddock: *FEMS Microbiol., Letters*, **4**: 37, 1978.
- [14] Barber, M. and S. W. A. Kuper: *J. Pathol. Bact.*, **63**: 65, 1951.
- [15] Bordeleau, L. M. and R. Bartha: *Appl. Microbiol.*, **18**: 274, 1969.
- [16] Lennette, E. H., E. H. Spaulding and J. P. Truunt: *Manual of Clinical Microbiology*, 2nd ed. Amer. Soc. Microbiol., Washington, 1974, p. 271.
- [17] Levine, S. A.: *Mol. Gen. Genet.*, **150**: 205, 1977.