

# ONPG 圆片的制备和应用

安慧敏 徐迪诚 王 玲

(哈尔滨市卫生防疫站, 哈尔滨 150010)

田润芝 孙茹芹 韩 珍

(哈尔滨市结核病防治所, 哈尔滨 150076)

**摘要** 用国产材料及试剂, 自制  $\beta$ -半乳糖苷酶试验用 ONPG 圆片。经过菌种试验和临床实验室应用证明, 使用此种圆片与常规试管法和国外的同类圆片进行对比试验, 所得结果完全一致。此种圆片使用方便, 易于保存, 可以长期使用, 且节约试剂, 达到国外同类制品的质量, 有助于保证和提高细菌鉴定工作质量。

**关键词** ONPG 圆片, 制备, 应用

ONPG 试验在细菌鉴定工作中经常使用。它是通过一种有机化合物——O-硝基酚- $\beta$ -D-半乳糖吡喃甙(O-Notriphenyl- $\beta$ -D-Galactopyranoside)的分解间接测定细菌是否存在  $\beta$ -半乳糖苷酶( $\beta$ -Galactosidase), 借以判定该菌种有无潜在分解乳糖的能力。

目前, 我国各细菌实验室进行 ONPG 试验均采用 ONPG 胨水(常规法), 但由于配制的基质不稳定, 保存使用期短, 容易失效, 而市售的 ONPG 胨水小管买入时有些已经变黄色无法使用。80 年代以来, 国外已改用 ONPG 圆片(ONPG Disc), 有成品出售<sup>[1]</sup>。该圆片可以快速出现正确结果, 长期保存耐用, 但此法在我国尚未建立。

1994 年以来, 我们采用国产材料和试剂研制成“ONPG 圆片”。经过反复实验观察, 并在北京、天津、沈阳、长春、齐齐哈尔和呼和浩特等地的 10 个微生物实验室推广使用, 一致认为, 效果良好。从而为我国的细菌鉴定工作提供一种新诊断用品, 填补了国内空白。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 邻硝基苯- $\beta$ -D-半乳糖甙:** 中国科学院上海生化研究所东风生化技术公司生产。

**1.1.2 进口 ONPG 圆片:** 日本日水制药株式会社出品, 商品号: 05182。

**1.1.3 滤纸圆片:** 将新华造纸厂生产的定性滤纸用打孔器打成直径 6mm 的 4 层厚小圆片, 置平皿中  $1 \times 10^5$  Pa 高压蒸汽灭菌 15min。

**1.1.4 培养基:** 自制培养菌种使用的普通营养琼脂平板或血液琼脂平板。

**1.1.5 供试菌株:** 实验用细菌共 22 个属 39 个种 324 株, 由中国科学院微生物研究所、中国药品生物制品检定所、长春生物制品研究所、天津医科大学、辽宁省卫生防疫站、北京医科大学附属第三医院等单位提供, 大部分为标准菌种, 少部分为临床参考菌株。

**1.1.6 ONPG 圆片制备<sup>[2, 3]</sup>:** 首先测出每张滤纸圆片的饱和吸水量, 配好无菌 ONPG 试剂(成分: ONPG 500mg, 0.01mol/L, pH7.2 的  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  30ml, 乳糖适量), 倾入盛有灭菌滤纸圆片的平皿中, 均匀地浸泡滤纸圆片, 然后吸出多余的试剂, 将平皿置于孵箱内低温干燥, 制成每个圆片 ONPG 含量为  $640\mu\text{g}/\text{片}$ 。将该圆片置于含干燥剂的褐色无菌小瓶中, 放  $4^\circ\text{C}$  冰箱贮存备用。

**1.1.7 ONPG 蛋白胨水:** 按文献[4]制备, 分装

小试管, 常规对照用。

## 1.2 实验方法

**1.2.1 菌种培养:** 将实验用菌种进行分离纯化培养, 使用对数增殖期的新鲜培养物接种。

**1.2.2 接种试验:** 自制 ONPG 圆片与常规法对照, 同时接种进口 ONPG 圆片。接种时, 将 ONPG 圆片一片置无菌小试管中, 加 1ml 无菌水, 刮取细菌一白金耳接种。常规法直接将细菌接种于 ONPG 蛋白胨水中。每次试验均设空白管(不接种细菌), 同时接种大肠埃希氏菌为阳性对照, 接种普通变形菌为阴性对照, 进行质控。

**1.2.3 结果观察:** 37℃ 培养 4h 及 20h, 分别观察 2 次; 以不变色(同空白对照)为阴性, 变黄色为阳性。

**1.2.4 圆片质量及稳定性试验:** 取不同部位的圆片(在制备当时及 4℃ 冰箱保存 2、4、6 个月), 用质控菌进行接种试验, 观察结果。对同一菌株, 取自不同部位及不同时间的圆片, 其试验结果一致, 可视为圆片含药量均匀, 质量稳定。

## 2 结果

取制备当时和置 4℃ 冰箱保存 2、4、6 个月以后不同部位的 ONPG 圆片, 分别接种质控菌株进行质量及稳定性试验检查, 所得结果完全一致。

用 ONPG 圆片接种 22 个属 39 个种的 324 株细菌, 检查  $\beta$ -半乳糖苷酶的结果见表 1。

表 1 56 株细菌的 ONPG 试验检查结果

(阳性数/菌株数)

菌名	株数	常规法		自制圆片		进口圆片**	
		4h	20h	4h	20h	4h	20h
埃希氏菌属 大肠埃希氏菌( <i>Escherichia coli</i> )	75	75/75	75/75	75/75	75/75	75/75	75/75
勒克氏菌属 非脱羧勒克氏菌( <i>Leclercia adcarboxylata</i> )	1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1
志贺氏菌属 痢疾志贺氏菌( <i>Shigella dysenteriae</i> )	1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1
福氏志贺氏菌( <i>S.flexneri</i> )	62	0/62	0/62	0/62	0/62	0/5	0/5
宋内氏志贺氏菌( <i>S.sonnei</i> )	17	12/17	17/17	17/17	17/17	3/3	3/3
沙门氏菌属 伤寒沙门氏菌( <i>Salmonella typhi</i> )	1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1
鼠伤寒沙门氏菌( <i>S.typhimurium</i> )	1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1
鸡沙门氏菌( <i>S.gallinarum</i> )	1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1
柠檬酸杆菌属 弗氏柠檬酸杆菌( <i>Citrobacter freundii</i> )	2	1/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2
爱德华氏菌属 迟钝爱德华氏菌( <i>Edwardsiella tarda</i> )	1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1
沙雷氏菌属 液化沙雷氏菌( <i>Serratia liquefaciens</i> )	1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1
深红沙雷氏菌( <i>S.rubidaen</i> )	1	0/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1
克雷伯氏菌属 产酸克雷伯氏菌( <i>Klebsiella oxytoca</i> )	2	0/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2
肺炎克雷伯氏菌( <i>K.pneumonia</i> )	1	0/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1
臭鼻克雷伯氏菌( <i>K.rhinoscleromatis</i> )	1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1
肠杆菌属 产气肠杆菌( <i>Enterobacter aerogenes</i> )	2	0/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2
阴沟肠杆菌( <i>E.cloacae</i> )	1	0/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1
阪崎肠杆菌* ( <i>E.sakazaku</i> )	2	1/2	2/2	2/2	2/2	1/2	2/2
变形菌属 普通变形菌( <i>Proteus vulgaris</i> )	5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
奇异变形菌( <i>P.mirabilis</i> )	2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2

续表 1

菌 名	株数	常规法		自制圆片		进口圆片**	
		4h	20h	4h	20h	4h	20h
耶尔森氏菌属 鼠疫耶尔森氏菌( <i>Yersinia pestis</i> )	17	13/17	15/17	15/17	16/17	2/4	3/4
小肠结肠炎耶尔森氏菌( <i>Y. enterocolitica</i> )	1	1/1	1/1	1/1	1/1		
假结核耶尔森氏菌( <i>Y. pseudotuberculosis</i> )	2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2
弧菌属 霍乱弧菌( <i>Vibrio cholerae</i> )	2	0/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2
霍乱弧菌(非 01 群)( <i>V. cholerae, non-01</i> )	25	26/25	24/25	23/25	25/25	2/2	2/2
气单胞菌属 嗜水气单胞菌( <i>Aeromonas hydrophila</i> )	44	35/44	40/44	38/44	42/44	3/3	3/3
温和气单胞菌( <i>A. sobria</i> )	2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2
邻单胞菌属 类志贺邻单胞菌( <i>Plesiomonas shioelloides</i> )	3	2/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3
肠球菌属 粪肠球菌( <i>Enterococcus faecalis</i> )	5	0/5	2/5	0/5	2/5	0/5	0/5
屎肠球菌( <i>E. faecium</i> )	1	0/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1
链球菌属 化脓性链球菌( <i>Streptococcus pyogenes</i> )	1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1
无乳链球菌( <i>S. agalactiae</i> )	1	0/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1
肺炎链球菌( <i>S. pneumoniae</i> )	2	0/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2
葡萄球菌属 金黄葡萄球菌( <i>Staphylococcus aureus</i> )	1	0/1	1/1	0/1	1/1		
假单胞菌属 铜绿假单胞菌( <i>Pseudomonas aeruginosa</i> )	32	0/32	0/32	0/32	0/32	0/32	0/32
黄单胞菌属 嗜麦芽糖黄单胞菌* ( <i>Xanthomonas maltophilia</i> )	8	6/8	8/8	8/8	8/8	3/4	4/4
黄杆菌属 气味黄杆菌* ( <i>Flavobacterium odoratum</i> )	5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/2	0/2
产碱菌属( <i>Alcaligenes</i> spp.)	14	0/14	0/14	0/14	0/14	0/2	0/2
不动杆菌属( <i>Acinetobacter</i> spp.)	22	0/22	0/22	0/22	0/22	0/3	0/3

\* 离心后判定(转速:3000r/min; 时间:15min)

\*\* 进口圆片只作一部分

表 1 结果表明,用自制 ONPG 圆片与进口 ONPG 圆片进行 ONPG 试验的结果相一致,均较常规法快速出现阳性结果。

### 3 讨论

#### 3.1 自制 ONPG 圆片的优点

用自制 ONPG 圆片检查 22 个菌属 39 个种的 324 株细菌的  $\beta$ -半乳糖苷酶,其中包括肠杆菌科的某些菌属、弧菌属、链球菌属和肠球菌属的细菌,均能出现不同特征的理想结果。自制 ONPG 圆片与进口 ONPG 圆片的  $\beta$ -半乳糖苷酶检出符合率为 100%;阳性者均在 4h 出现,而常规 ONPG 胨水法则出现较为缓慢,这种结果与文献报道基本一致<sup>[3,5]</sup>。

自制 ONPG 圆片至少 6 个月有效,而常

规法 ONPG 胨水仅能使用 1~2 个月。制备 ONPG 圆片消耗的材料及试剂成本与常规法虽大体相当,但较进口制品能节约费用 70%~80%。

#### 3.2 制备 ONPG 圆片的技术关键

首先,要考虑吸附在圆片上的 ONPG 试剂游离脱出后 O-硝基酚为弱酸性,因为它是一种无色的苯环型互变异性体(benzenoid)<sup>[6]</sup>,需创造 pH7.0~7.5 的缓冲条件,使之解离后呈现黄色,有助于低浓度 ONPG 时的检出。其次,要在基质中添加适量乳糖,它是某些细菌产生  $\beta$ -半乳糖苷酶的诱导剂。第三,是将菌体保存于 0.1mol/L 缓冲液中,使细菌的  $\beta$ -半乳糖苷酶活化<sup>[7]</sup>(试验时加入蒸馏水也无影响)。

#### 3.3 使用 ONPG 圆片应注意的问题

**3.3.1** 保存在4℃冰箱中的ONPG圆片,加入蒸馏水以后,应充分振荡,有利于使ONPG试剂从圆片中迅速溶解和脱出。

**3.3.2** 像阪崎肠杆菌产生黄色素一类的细菌(色素原型),判定ONPG试验结果前,要进行离心处理,以排除黄色素的干扰。

**3.3.3** 葡萄糖是一种 $\beta$ -半乳糖苷酶的阻碍剂,可使ONPG试验结果出现缓慢,故不宜用含此种糖的培养基培养细菌作ONPG试验,在Lederberg氏<sup>[6]</sup>的研究报告中也十分强调了这一点。

**致谢** 承日本高知市民病院临床检查部藤田主任、京都大学病毒研究所石本教授惠赠文献及试剂;中国科学院微生物研究所、北京医科大学第三附属医院、天津医科大学微生物教研室、内蒙古自治区流行病防治研究所、辽宁省卫生防疫站、哈尔滨市地方病防治站、齐齐哈尔市第一

医院及齐齐哈尔市卫生防疫站等单位协助应用考核,一并致谢。

## 参 考 文 献

- [1] 阪崎利一. 細菌・真菌・原蟲用培地マニエアル(第4版), 日本製菓株式会社, 東京, 1993, 231.
- [2] Clarke, Steel. Identification Methods for Microbiologists, Part A, Academic Press, London, 1986, 314.
- [3] Smith P B, Rhoden D L, Tomfohrde K M. J Clin Microbiol, 1975, 13(1): 359.
- [4] Barrow G I, Feltham R K. Cowan and steel's manual for identification of medical bacteria (3rd ed), Cambridge university Press, 1993, 206.
- [5] Belliveam R R, Grayson J M, Butler T J. Am J Clin Pathol, 1969, 8(50): 126.
- [6] Lederberg J. J Bacteriol, 1950, 13(60): 381.
- [7] Macfaddin著, 竹田美文・他(監訳). 病原細菌の生化学的検査法, 日本医学書院, 東京, 1984, 106.

## PREPARATION AND APPLICATION OF "ONPG DISC"

An Huimin Xu Dicheng Wang Ling

(Sanitation and Antiepidemic Station of Harbin, Harbin 150010)

Tian Runzhi Sun Ruqin Han Zhen

(Harbin Institute of Prevention and Cure for Tuberculosis, Harbin 150076)

**Abstract** We developed the ONPG disc for  $\beta$ -galactosidase test with the materials and reagents made in China. After bacterial strain inoculation and clinical laboratory application, it had the same experimental results in disc method and conventional test tube method compared with the homologous products from overseas. It has some unique characteristics such as quite convenient in use, easily conserved, with long-term validity and economic in reagent usage. The ONPG disc now meets the international standard and can ensure and increase the quality of bacterial identification in our country.

**Key words** ONPG disc, Preparation, Application