

最低抑制浓度法实验技术的改进与探析

夏洪梅, 陈 珊, 刘东波, 李 凡
(东北师范大学 生命科学学院, 吉林 长春 130024)

摘 要: 在培养基平板上, 接种同一种菌, 再置入含不同药物浓度的滤纸片, 进行最低抑制浓度实验。结果表明, 用滤纸片法测定药物的最低抑制浓度, 比传统方法效果更好, 且更利于操作和定性研究。

关键词: 滤纸片; 最低抑制浓度; 接种菌种

中图分类号: Q93 文献标识码: A doi 10.3969/j.issn.1672-4305.2010.05.024

Improvement and analysis on the minimum inhibitory concentration experiment

XIA Hong-mei, CHEN Shan, LIU Dong-bo, LI Fan
(School of Life Science, Northeast Normal University, Changchun 130024, China)

Abstract The authors inoculate the same kind of germ on a flat panel and place filter paper slices saturated by different concentrations of drug. Then on the flat panel the experiment of minimum inhibitory concentration is carried out. Its result shows that compared with traditional method, the filter paper method is better for operation and qualitative research.

Key words filter paper slice; minimum inhibitory concentration; inoculating bacteria

近年来, 在临床上用来治疗由细菌引起的各种疾病主要是抗生素^[1]。由于抗生素是生物在其生命活动过程中产生的一种次生代谢产物或其人工衍生物, 它们在很低浓度时就能抑制或影响其它生物的生命活动, 因而可用作优良的化学治疗剂^[2]。针对抗生素而言, 最低抑制浓度就是在体外测定的能够抑制细菌生长的最低药物浓度, 英文缩写为 MIC。不同的药物, 即使对同一种微生物的抑制能力也可能不同, 所以可以通过测定 MIC 来确定某种抗生素的抑菌能力。青霉素是一种十分理想的抗生素, 它具有低毒、抗菌活力高等优点, 但也存在易过敏、不稳定、不耐酸、易产生耐药菌株等缺点^[3], 以及对革兰氏阳性菌抑菌效果好, 对革兰氏阴性菌抑菌效果差的特点。下面以青霉素为例, 探析青霉素最低抑制浓度法实验技术的改进。

1 基本原理

最低抑制浓度是指药物抑制微生物生长的最低浓度。其测定方法可在液体或固体培养基中进行。

液体稀释法是在试管中加入适用于测试菌生长的液体培养基作为稀释液, 将不同剂量的药物加入

各试管中, 形成一组不同递减浓度的药物试管, 然后加入一定量的测试菌, 在合适的温度下培养一定时间后, 用肉眼观察其混浊度或用光电比色计作比浊测定, 以不长菌的药物试管剂量为该药物的最低抑制浓度 (MIC)。此法的优点是药物剂量分散的很均匀, 缺点是测试菌的接种量难以控制且测试菌过多时工作量大, 费时。

固体法是将不同剂量的药物于一定量融化的固体培养基相混合, 制成含不同药物浓度的递减药物平板。将待测菌制成适当浓度的菌液, 接种于含药物平板上, 再将平板放入温箱培养判断菌的生长情况, 以该菌不生长的平板所含药剂浓度为该药的最低抑制浓度 (MIC); 有的以接种点长出的菌落数少于 5 个者为最低抑制浓度 (MIC)。固体法的优点是一个平板上可同时接 20~25 个菌株; 缺点是药物不易分散均匀, 而且测试菌的接种量难以控制。

上述两种方法的缺点都是接种量难以控制, 接种量不定, 给实验结果带来误差。而采用滤纸片法则克服上述两种方法的不足, 药物分散均匀, 且更利于操作和定性研究, 取得了很好实验的效果。



2 实验器材

2 1 菌种

金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*), 大肠杆菌 (*Escherichia coli*), 为本实验室保藏菌种。

2 2 培养基

牛肉膏 3g 蛋白胨 10g NaCl 5g 琼脂 20g PH 7.0, 1×10^5 Pa灭菌 20min

2 3 器具

培养皿、移液管、试管、吸耳球、镊子、三角瓶、圆形打孔器打下的滤纸片、注射器、恒温培养箱等。

2 4 药物

青霉素、磷酸盐缓冲液。

3 操作步骤

3 1 药物原液的配制

按照图 1 配制青霉素原液, 使其浓度为 $100\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

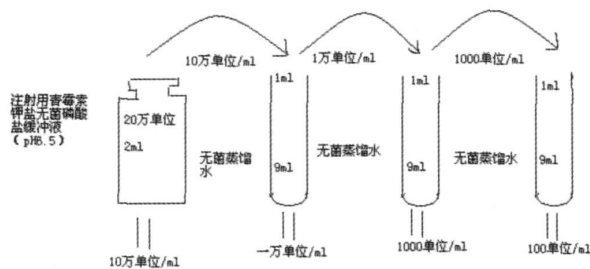


图 1 青霉素原液配制流程

(1)磷酸盐缓冲液的配制:

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 1.44g
 KH_2PO_4 0.24g
KCl 0.2g
NaCl 8.0g

加水定溶 1000 mL, 1×10^5 Pa灭菌 20min

(2)用一次性注射器吸取 2mL 磷酸盐缓冲液, 注入 20万单位的青霉素钠瓶中, 将青霉素钠溶解, 稀释至 10万单位 /mL。用一支 1mL 无菌移液管吸取 1mL10万单位 /mL青霉素钠溶液, 加入 9mL 无菌水试管中充分摇匀, 此为 1万单位 /mL, 以此类推为 $1000\mu\text{g}/\text{mL}$ 、 $100\mu\text{g}/\text{mL}$ [4]。

3 2 菌液的配制

将已活化两代的金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)和大肠埃希氏菌 (*Escherichia coli*), 接种于牛肉膏蛋白胨液体培养基, 37°C 培养 6~8h 使菌液达 $10^6/\text{mL}$ 作测试菌液。

3 3 配制不同浓度的含药物试管

(1)取 10支试管, 第一支试管加入 1.9 mL 培养液, 其余 9支试管加入 1 mL培养液 (牛肉膏 3g 蛋白胨 10g NaCl 5g pH 7.0, 1×10^5 Pa 灭菌 20min)

(2)用 1mL 无菌移液管吸取青霉素原液 0.1 mL加入 1.9 mL培养液试管中, 使最终药物浓度为 $5\mu\text{g}/\text{mL}$, 再用另一支 1 mL无菌移液管从药物浓度为 $5.0\mu\text{g}/\text{mL}$ 的试管中吸 1 mL加入第二支培养液

表 1 不同编号试管溶液配制数据表

试管编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
培养液 (mL)	1.9	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
青霉素药物原液 (mL)	0.1	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
最终药物浓度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	5.0	2.5	1.25	0.63	0.31	0.16	0.08	0.04	0.02	0.01

对照组: 培养液 1 mL + 药物 1 mL培养液 1.8 mL + 菌液 0.2 mL

试管中, 以此类推, 分别制成药物浓度为 $5.0\mu\text{g}/\text{mL}$ 、 $2.5\mu\text{g}/\text{mL}$ 、 $1.25\mu\text{g}/\text{mL}$ 、 $0.63\mu\text{g}/\text{mL}$ 、 $0.31\mu\text{g}/\text{mL}$ 、 $0.16\mu\text{g}/\text{mL}$ 、 $0.08\mu\text{g}/\text{mL}$ 、 $0.04\mu\text{g}/\text{mL}$ 、 $0.02\mu\text{g}/\text{mL}$ 、 $0.01\mu\text{g}/\text{mL}$ 的含药试管。也可以用自动取液器代替移液管, 它主要用于多次重复的快速取液, 十分方便 [5]。(见表 1)

3 4 做混菌平板

将两瓶牛肉膏蛋白胨培养基溶化并冷却 50°C 左右时, 各加入金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aur-*

reus)和大肠埃希氏菌 (*Escherichia coli*)悬液 1 mL 混菌后, 分别倾注于无菌平皿中, 制成两个混菌平板, 冷却后备用 [6]。

3 5 标明

在已凝固的甲、乙两个混菌平板背面, 用记号笔在培养皿底标明 1 2 3 4 5 编号, 每一编号对应相同编号试管药物浓度 [7]。

3 6 贴滤纸片

用无菌镊子取滤纸片分别放入不同药物浓度试

管,在容器内壁沥去多余的药液,以无菌操作将滤纸片对号贴在平板的相对应编号的药物浓度区域,再倒置于 37℃ 恒温培养 18~24h^[8]。

4 观察记录

以滤纸片周围不生长菌、或以长出的菌落数少于 5 个者的滤纸片所含药剂浓度为该药物的最低抑制浓度 (MIC)^[9]。从培养皿中可以直观清晰地看出:接金黄色葡萄球菌的平板,编号 1 的滤纸片周围透明圈最大,编号 2 的滤纸片周围透明圈较大,编号 3 的滤纸片周围透明圈最小,开始不长菌,编号 4、5 的滤纸片周围没有透明圈。查对照表得出,青霉素对金黄色葡萄球菌的最低抑制浓度 (MIC) 为编号 3 的滤纸片对应的药物浓度,即 1.25 μg/ml。而接大肠杆菌的平板,滤纸片周围都长菌,说明青霉素对大肠杆菌即革兰氏阴性菌抑菌效果差,对金黄色葡萄球菌即革兰氏阳性菌抑菌效果好。



图2 金黄色葡萄球菌平板



图3 大肠杆菌平板

5 采用滤纸片法测定药物的最低抑制浓度的探究

5.1 实验结果准确

液体稀释法和固体法要多次取菌,很难做到接种量相同,导致实验误差;而采用滤纸片法则克服上述缺点,一次取菌,平板接菌量均匀,实验结果比较准确。

5.2 操作方法简易

液体稀释法和固体法看似简单,但在实际操作过程中要用移液管多次取菌,很麻烦;固体法要做连续递减的若干药物平板,费时费力。而采用滤纸片法则一次取菌于平板上,再用无菌镊子取滤纸片分别放入不同药物浓度试管,沥去多余的药液后放入相对应编号平板上,轻轻按压即可^[10]。

5.3 便于培养观察

同一平板上,分区内菌生长均匀,可以用肉眼数出分区内菌的数目,不同浓度的含药滤纸片对菌的抑制作用在平板上清晰可见。以不生长菌、或以长出的菌落数少于 5 个者滤纸片所含药剂浓度为该药的最低抑制浓度 (MIC),有利于控制培养时间及对比观察鉴定。

5.4 减少污染率

液体稀释法和固体法要多次取菌,污染的情况比较严重,而采用滤纸片法一次取菌,大大降低了污染的机会,实验成功率高。

参考文献 (References):

- [1] 沈萍. 微生物学 (第三版). [M] 北京: 高等教育出版社, 2000 151-152
- [2] 周德庆. 微生物学教程 (第四版) [M]. 北京: 高等教育出版社, 1996 212-213.
- [3] 周德庆. 微生物学教程 (第一版) [M]. 北京: 高等教育出版社, 1993 216
- [4] 张龙翔, 张庭芳, 李令媛. 生化实验方法和技术 (第二版) [M]. 北京: 高等教育出版社, 1997 463-464
- [5] 沈萍, 陈向东. 微生物学实验 (第四版) [M]. 北京: 高等教育出版社, 2007 29-30
- [6] 钱国英. 生化实验技术与实施教程 (第一版) [M]. 浙江大学出版社, 2009 301-302
- [7] 黄秀梨. 微生物学实验指导 [M]. 北京: 高等教育出版社, 1999 62-63
- [8] 范秀容, 李广武, 沈萍. 微生物学实验 (第二版) [M]. 北京: 高等教育出版社, 1989 157-158.
- [9] 辜建平, 张庆, 刘邦芳. 微生物生长谱法实验技术的改进与探析 [J]. 微生物学通报, 2005 32 (1): 90-93.
- [10] 沈萍, 范秀容, 李广武. 微生物学实验 (第三版) [M]. 北京: 高等教育出版社, 1999 111-114

收稿日期: 2010-04-12

修改日期: 2010-06-28

作者简介: 夏洪梅 (1969-), 女, 本科, 东北师范大学生命科学学院中心实验室工程师。