

海洋发光细菌快速测定 四环素效价的方法研究*

朱文杰 杨颐康

(华东师范大学生物学系)

目前用微生物测定抗菌素的效价很费时,操作也较繁琐。四环素效价的测定亦然。我们的试验证实,四环素对明亮发光杆菌(*Photobacterium Phosphoreum*) A₂ 的发光的影响是在低浓度时刺激发光,较高浓度时抑制发光,在短时间内,所用的四环素浓度跟抑制发光的效应呈现依存关系。据此,我们利用四环素抑制发光的作用,试验了快速测定四环素效价的方法。

一、材料和方法

1. 菌种

明亮发光杆菌(*P. phosphoreum*) A₂, 由本实验室自海鱼分离获得^[1]。

2. 培养基及培养方法

液体培养基按 Eley^[3], 固体培养基按 Hendrie^[4]。用24小时培养的斜面,以3% NaCl 制成细胞悬液,接入液体培养基,接种量约5万/毫升,于20℃振荡培养至对数期收获细胞。

3. 药品

①四环素标准品:用0.01N HCl溶解后,再以蒸馏水稀释至1毫克/毫升溶液备用。测定时再以pH6.5磷酸缓冲液稀释至所需浓度。

②四环素发酵液:由上海第三制药厂提供摇瓶培养的发酵液。过滤除去菌丝体,未经别的处理。

4. 发光强度的测定方法

①菌悬液的制备:以振荡液体培养至对数

中期的明亮发光杆菌,用pH6.5的含3% NaCl 的磷酸缓冲液稀释到适当浓度,使测定时细胞含量为 5×10^7 细胞/毫升,发光强度约在2—10伏特。

②以一系列不同浓度的四环素加入上列菌液中,然后每隔10分钟或15分钟测定一次发光强度,对照管仅加同量的缓冲液。

③光强度测定:用自制测定仪测定之^[2]。主要为GDB-10M型光电倍增管,光敏范围为波长3800—6500埃,最大敏感波长为4400±300埃。以输出稳定的最大电压值作为发光强度的指标。测定前需将试样剧烈振摇,使获得充足的氧气,以避免氧气不足影响发光。

二、结 果

在本试验条件下,该菌的发光与生长的情况见图1。发光高峰约在对数中期,就培养时间而言,要比细胞数量达到最大值时早5—6小时。发光达到峰值之后,维持一段时间,到静止期开始下降。据报道是由于萤光酶的失活,可能是细胞内逐渐产生了抑制物的缘故^[5]。

1. 静止期的细胞对四环素的反应

四环素浓度较低时,发光强度反而高于对照,并随浓度增加而光强递增。在四环素浓度15—20微克/毫升时达到光强增加的最大值,

* 本项工作在试验中获得上海第三制药厂四环素车间有关同志的大力协助,谨此致谢。

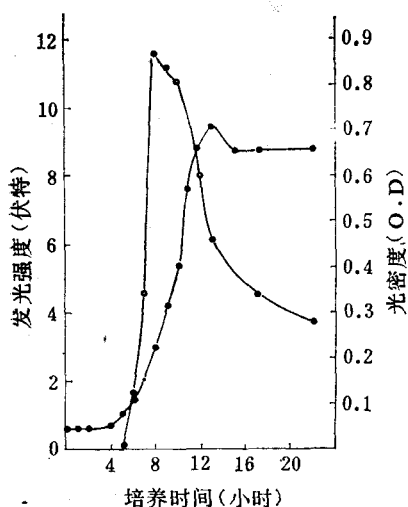


图1 明亮发光杆菌A₂的生长与发光的关系
—●—发光；—•—生长。
(20℃摇瓶液体培养)

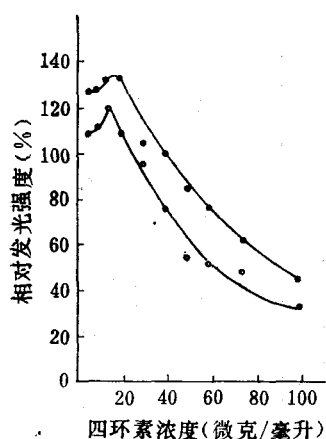


图2 四环素对静止期的明亮发光杆菌A₂的影响
—•—加入四环素30分钟后测定
—●—加入四环素45分钟后测定

然后就开始下降，约到40微克/毫升时低于对照，并随四环素浓度的增加而光强受到抑制越明显，如图2所示（以空白对照的发光强度为100%，其余依此折算）。

2. 对数中期的细胞对四环素的反应

此时期细胞发光达到高峰期（见图1）。由于细胞对四环素的作用很敏感，加入四环素后发光立即受到抑制，发光强度下降，并无刺激发光的现象。发光强度与所用的四环素浓度

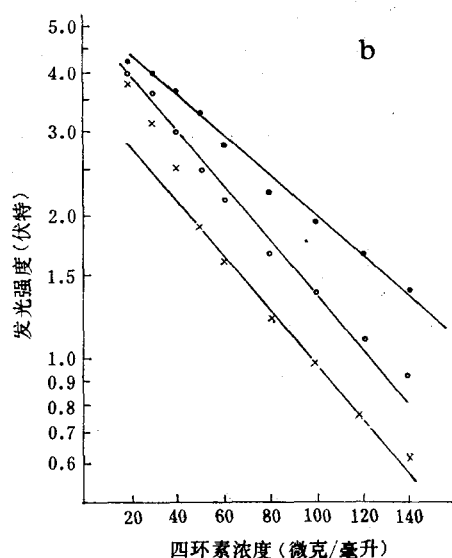
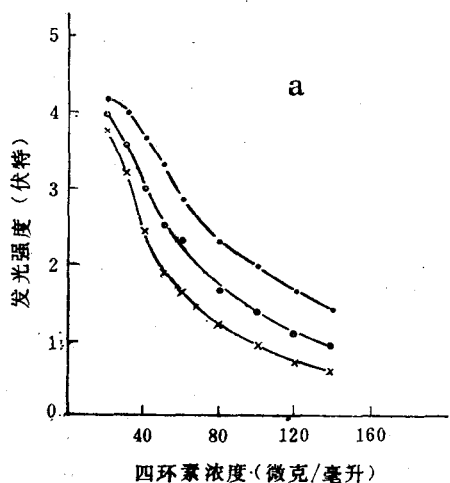


图3 对数中期的明亮发光杆菌A₂

对四环素的反应

a为发光强度与四环素浓度的普通座标图；b为半对数座标图；
—•—为四环素加入30分钟后测定；
—●—为四环素加入45分钟后测定；
—×—为四环素加入60分钟后测定。

呈现单调下降的一一对应关系，并随时间的延长而加剧（见图3a）。若以发光强度的常用对数值跟四环素浓度作图，则可得一直线（见图3b）。

现用指数关系式来表示它们的关系：

$$L = a \cdot G^{bc}$$

其中L为发光强度，c为四环素浓度，G为常用对数的底，等于10，a，b均为常数。对上

式两边取对数, 则可化为直线方程:

$$\text{Lg}L = \text{Lg}a + bc$$

即发光强度的常用对数值 $\text{Lg}L$ 跟四环素浓度 c 呈线性关系。经回归分析¹⁾, 表明发光强度的对数值跟四环素浓度的线性相关是显著的。在四环素浓度小于30微克/毫升, 大于140微克/毫升时有偏离, 因而实际线性段为30—140微克/毫升的范围。

3. 对数后期的细胞对四环素的反应

在四环素浓度低于50微克/毫升时, 开始已有刺激发光的现象, 但当各浓度的发光均低于对照时, 也即抑制发光的效应出现后, 线性关系也很显著。

4. 四环素发酵液对发光细菌发光的影响

当以不同稀释度的四环素发酵液加入到处于对数中期的明亮发光杆菌 A_2 的细胞悬液中

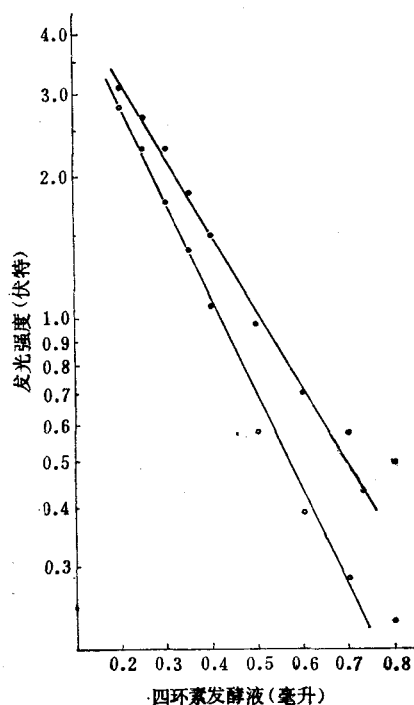


图4 四环素摇瓶发酵液对明亮发光杆菌 A_2 的作用

(以发酵液稀释10倍, 分别取0.15、0.2、0.25……0.8毫升, 再加入菌悬液, 使最终体积为10毫升)

- 一加四环素发酵液30分钟后测定
- 一加四环素发酵液45分钟后测定

时, 结果见图4。可见与四环素标准品对该菌的效应是相同的。其线性关系也是显著的²⁾。

由四环素发酵液抑制发光效应, 对照四环素标准品制成标准曲线, 来决定其相应的效价, 其结果如表1。

表 1

编号	样品 稀释度	由标准曲线查得之相应效价 (单位/毫升)	效价 平均值	化学法所测的效价* (单位/毫升)
13	1/200	17800	17100	17070
	1/400	16400		
14	1/200	20400	20400	17295
	1/400	20400		
15	1/200	17200	15800	16800
	1/400	14400		
16	1/200	19000	18900	16980
	1/400	18800		
17	1/200	17600	16400	16620
	1/400	15200		
18	1/200	21600	21200	16800
	1/400	20800		
19	1/200	18400	18700	17160
	1/400	19000		
20	1/200	19400	18900	17700
	1/400	18400		
21	1/200	17600	17600	18420
	1/400	17600		
22	1/200	18200	17700	17700
	1/400	17200		

* 数据由上海第三制药厂四环素车间提供。

1) 回归计算上列三曲线的相关系数 ρ 分别为 -0.996 , -0.978 , -0.988 , 因而 $|\rho|$ 均大大高于该抽样条件下 $|\rho_{\alpha}|$ 的值 (当 $n-2=6$, $\alpha=1\%$ 时, $\rho_{\alpha}=0.834$)。相关系数 ρ 的计算公式为:

$$\rho = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2 \cdot \sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2}}$$

2) 回归计算上列二曲线的相关系数 ρ 分别为 -0.958 , -0.953 , 而当 $n-2=8$, $\alpha=1\%$ 时, $\rho_{\alpha}=0.765$ 。

从表 1 可见, 由同一样品的两个稀释度所得结果还是很接近的, 在测定情况下, 前述线性关系是存在的。同化学法所测得的结果相比较, 虽有高有低, 但比较接近。因此用发光细菌的发光来测效价是实际可行的。

三、讨 论

由不同时期的细胞对四环素的反应来看, 一旦呈现发光, 强度随四环素浓度增加而下降之后, 两者就呈单调下降的函数关系, 四环素发酵液的效应也与此相似。根据我们的试验, 四环素对于细菌生长的对数中期的细胞没有刺激发光上升的现象, 因而结果更为可靠。作用时间以 30 分钟较好, 因为线性关系更显著。当然, 若采用几个时间的平均值, 也是可行的。

发光的下降与当时细胞的存活率有相应的关系, 即四环素浓度越大, 其中细胞存活率也越小, 光强下降越多。光强的下降反映了四环素对菌体有直接作用, 其作用机制我们将进一步研究, 通过实验证实, 用明亮发光细菌 A₂

测定四环素的效价是快速简便、切实可行的一种方法。

主要参考文献

- (1) 杨颐康等, 1980. 发光细菌的分离培养和鉴定. 上海师范大学学报 3: 87—92.
- (2) 杨颐康等, 1981. 环境因子对发光细菌生长和发光的影响. 海洋与湖沼 12 (3): 249—253.
- (3) Eley, M.H., 1972. Optimal environmental Condition and nutrient Concentration for the synthesis of bacterial Luciferase in photobacterium phosphoreum. *J. Gen. Microbiol.* 72: 415—417.
- (4) Hendrie, M.G., W.Hodgkiss and J.MR. Sheman, 1976. The identification, taxonomy and Classification of Luminous bacteria. *J. Gen. Microbiol.* 64: 151—169.
- (5) Carole, A. Reeve and Thamas O. Baldwin, 1981. Luciferase Inactivation in the Luminous marine bacterium *Vibrio harveyi*. *J. Bacterio.* 146(3): 1038—1045.

A QUICK ASSAY FOR TETRACYCLINE

Zhu Wenjie and Yang Yikang

(Department of Biology, East China Normal University)

Abstract

An anti-luminescent assay of Tetracycline that, like many antibiotic substances, quenches the light of marine form luminous bacteria effectively was studied with *Photobacterium phosphoreum* A₂ as an indicator. Good results were obtained in tests with luminous bacterial concentration ca. 5×10^7 cells/ml. Light intensity was determined by photomultiplier (GDBIOM) of photoluminometer. Experimental data were expressed as voltage or a percentage of a control. Within the range of 30 μ /ml to 140 μ /ml, the curves of tetracycline concentration plotted against light intensity gave good linearity. The correlation coefficient of the curves obtained were -0.996, -0.978, -0.988. The tests could be done within an hour. So, comparing with cylinder plate assay, this one is faster and simpler.