

溶菌酶抑菌作用检测方法研究

杨露青, 薛金花, 何爱桃, 周 艺, 李 程, 袁国保

(南华大学公共卫生学院, 湖南 衡阳 421001)

主题词 溶菌酶; 细菌; 真菌; 抑菌作用; 检测方法

摘要 目的 探讨溶菌酶抑菌作用的检测方法。方法 以金黄色葡萄球菌、白色葡萄球菌、乙型溶血性链球菌、枯草杆菌、蜡样芽胞杆菌、大肠杆菌、奇异变形杆菌、铜绿假单胞菌、白色念珠菌为实验菌,以琼脂平板打孔法,纸片法及肉膏汤液体培养法检查各种浓度的溶菌酶抑菌效果。结果 纸片法显示溶菌酶对实验菌有抑制和溶解作用;肉膏汤液体培养法显示溶菌酶可抑制枯草杆菌、蜡样芽胞杆菌出现菌膜生长,但对其他实验菌的抑菌现象肉眼观察难以区别;琼脂平板打孔法没有发现溶菌酶的抑菌作用。结论 纸片法是一种较好的检测溶菌酶抑菌作用的方法。

Exploration of the Test Way on Inhibitory Bacteria Action of Lysozyme

YANG Lu - Qing, XUE Jin - Hua, HE Ai - Tao, et al

(The public health faculty of nanhua university, hengyang hunan 421001, China)

MeSH lysozyme; bacterium; fungus; inhibitory action; determination method

ABSTRACT **Object** To explore the determination method on inhibitory bacteria action of lysozyme. **Method** In this article, the test bacteria were Staphylococcus aureus, Staphylococcus albus, Streptococcus hemolyticus, Bacillus subtilis, Bacillus cereus, Escherichia coli, P. mirabilis, P. aeruginosa and Candida albicans; and the inhibitory effect of different concentration of lysozyme was investigated by disk diffusion, nutrient broth medium and beating hole nutrient agar board diffusion test. **Results** Results of disk diffusion test showed that lysozyme could inhibit and dissolve test bacteria; results of nutrient broth medium test showed that lysozyme inhibited the C_2^+ aerobic Bacillus subtilis and bacillus cereus with growing of bacteria membrane compared with control group, but it is difficult to distinguish the inhibitory phenomenon of other bacteria by eyes; and the inhibitory phenomenon was not found in beating hole nutrient agar board diffusion test. **Conclusion** Disk diffusion has been proved to be a successful method for the determination of inhibitory bacteria action of lysozyme.

溶菌酶(lysozyme, LZM)广泛分布于人体、动物的正常组织和体液中,在植物中分布也很广泛,具有溶解和抑制细菌的作用^[1-3],是人体、动物体抵御细菌感染的一种非特异性重要物质。目前检测LZM的溶菌活性以及溶菌抑菌谱的方法不一。本文利用北京鼎国生物技术发展中心提供的LZM,研究LZM抑菌作用的检测方法。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验菌 革兰氏阳性球菌3种:金黄色葡萄球菌、白色葡萄球菌、乙型溶血性链球菌;革兰氏阳性杆菌2种:枯草杆菌、蜡样芽胞杆菌;革兰氏阴性菌3种:大肠杆菌、奇异变形杆菌、铜绿假单胞菌;真菌1种:白色念珠菌。

1.1.2 溶菌酶 北京鼎国生物技术发展中心提供(原编号:L6875)。

1.1.3 细菌培养基 用高压蒸汽灭菌培养基,主

要成份:胰蛋白胨1.0g、氯化钠0.5g、琼脂粉1.5g、蒸馏水100mL、氢氧化钠调pH为7.2,高压灭菌。

1.1.4 缓冲液 1/15 mol/L pH为7.0磷酸盐缓冲液。

1.2 实验方法

1.2.1 溶菌酶的稀释 用高压蒸汽灭菌1/15 mol/L pH为7.0磷酸盐缓冲液,将溶菌酶配成50000 u/mL后进行滤过除菌,稀释成以下浓度:25000 u/mL、10000 u/mL、5000 u/mL、2500 u/mL、1000 u/mL、500 u/mL、250 u/mL^[4]。

1.2.2 营养琼脂平板打孔 LZM扩散抑菌法 用上述培养基,将其加热全融,待冷却至50~55℃时分别加入上述细菌(24h培养物)50 μl/100 mL,混匀倾注无菌培养皿中,冷却后用无菌打孔器在培养基上打洞,在洞中加入上述各种稀释度溶菌酶10 μl,对照孔加入缓冲液10 μl,于37℃恒温箱中培养18~24 h,测量抑菌圈的直径。

1.2.3 营养琼脂平板 LZM纸片扩散抑菌法 用

上述培养基,将其加热全融,倾注无菌培养皿中,用无菌棉签将上述细菌分别涂布于培养基上,分别吸取上述稀释度溶菌酶 10 μl 于无菌纸片上,贴于接种细菌的平皿中,以 10 μl 缓冲液为对照,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱中培养 18~24 h,测量抑菌圈的直径。

1.2.4 肉膏汤液体培养 LZM 抑菌法 每种细菌取无菌试管 8 支,加入一定量的上述液体培养基,1~7 管 LZM 浓度如上述 25000 u/mL~250 u/mL,第 8 管不加 LZM 作为对照;用 1/15 mol/L pH 为 7.0 的磷酸盐缓冲液调整每管中营养成分,使其营养成分浓度保持一致,最终液体量为 3 mL/管;在 1~7 管接种上述实验菌(24 h 培养物)100 μl ,对照管加入缓冲液 100 μl ,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱中培养 18~24 h,观察细菌浊度和表面生长现象。

表 1 溶菌酶纸片扩散法的抑菌效果 单位:mm

酶浓度 u/mL	金黄色葡萄球菌	白色葡萄球菌	乙型溶血性链球菌	枯草杆菌	蜡样芽胞杆菌	大肠杆菌	奇异变形杆菌	铜绿假单胞菌	白色念珠菌
50000	9	9	6	4	4	7	11	9	-
25000	9	9	7	3	3	7	11	8	-
10000	8	8	7	-	-	8	7	5	-
5000	12	10	7	-	-	9	9	4	-
2500	12	11	7	-	-	8	7	4	-
1000	13	12	8	-	-	8	7	3	-
500	11	11	8	-	-	7	6	3	-
250	10	9	7	-	-	7	6	3	-
对照	-	-	-	-	-	-	-	-	-

2.3 肉膏汤液体培养 LZM 抑菌作用

液体中 LZM 浓度为 25000 u/mL、10000 u/mL 的革兰氏阳性芽胞杆菌:枯草杆菌、蜡样芽胞杆菌实验管与对照比较,实验管液体表面无菌膜生长,而对照管液体表面有菌膜生长,说明对这两种细菌有明显的溶解和抑制作用,对其他细菌的抑制作用不明显,用肉眼观察其浊度难以区别。

3 讨论

根据许多文献提供的营养琼脂平板打孔 LZM 扩散抑菌法,本实验室通过多次实验,仍然没有较理想的结果。本文采用 LZM 纸片扩散抑菌法,使用仪器少,操作简便,易于掌握,而且溶菌和抑菌作用明显,抑菌圈的大小显示该菌对 LZM 的敏感性,因此,纸片法是一种较好的检测 LZM 抑菌作用的有效检

2 结果

2.1 营养琼脂打孔 LZM 扩散抑菌法的抑菌作用

以上各种浓度 LZM 对实验菌没有抑菌圈。

2.2 营养琼脂平板 LZM 纸片扩散抑菌法的抑菌作用

LZM 抑菌效果见表 1。从抑菌圈的大小(表 1)可以看出, LZM 对革兰氏阳性球菌中的金黄色葡萄球菌、白色葡萄球菌和革兰氏阴性菌中的大肠杆菌、奇异变形杆菌的抑菌效果较好,对革兰氏阳性芽胞杆菌中的枯草杆菌、蜡样芽胞杆菌和革兰氏阴性菌中的铜绿假单胞菌的抑菌效果较差,对真菌-白色念珠菌没有抑菌作用。

测方法。

实验结果表明,北京鼎国生物技术发展中心提供的 LZM(原编号:L6875)具有一定的溶菌活性,但不是很理想,如何增强 LZM 抑菌范围和抑菌作用,将为 LZM 的应用开发出更广阔的前景。

参考文献

- [1] Mason DY and Taylor CR. The distribution of lysozyme in human tissues. *J Clin Pathol*, 1975, **28**: 124
- [2] Audy P, Quere DL, Leclerc D, et al. Electrophoretic forms of lysozyme activity in various plant species. *Phytochemistry*, 1990, **29** (4): 1 143~1 159
- [3] 高向阳. 萝卜溶菌酶抑菌效果的初步研究. 华南农业大学学报, 1997, **18** (2): 72~75
- [4] 杨培增. 抗生素对人泪液溶菌酶活性影响的动态观察. 眼科新进展, 1989, **9** (4): 6~10