

DOI: 10.3969/j.issn.1671-9638.2016.03.002

· 论 著 ·

结核分枝杆菌菌悬液光密度值与菌落计数的关联性

秦云贺, 王艺红, 郭庆龙, 王洪海, 张雪莲

(复旦大学生命科学学院, 上海 200438)

[摘要] 目的 建立一种基于光密度值计算结核分枝杆菌菌落数的可靠方法。方法 利用低频超声和玻璃珠研磨两种方法制备 H37Ra 菌悬液, 菌悬液 2 倍梯度稀释后, 分别测定各个稀释度菌悬液在 600 nm 处的光密度值 (OD₆₀₀ 值), 并分析 OD₆₀₀ 值与稀释倍数曲线, 确定最佳的菌悬液制备方法, OD₆₀₀ 线性范围, 以及 OD₆₀₀ 值与 CFU 关联曲线。结果 OD₆₀₀ 值为 0.1~0.6, 线性范围内 OD₆₀₀ 值与稀释倍数线性回归分析结果显示, 玻璃珠研磨法和低频超声法相关系数 (R^2) 分别为 0.98、1.00, 均呈良好的相关性, 且低频超声法比玻璃珠研磨法的相关性好, 其菌液分散更均匀。OD₆₀₀ 值与 CFU 值线性回归分析结果显示, 玻璃珠研磨法和低频超声法回归方程分别是: $CFU = 2.35 \times 10^7 \times OD_{600} + 4.42 \times 10^5$ 、 $CFU = 3.26 \times 10^7 \times OD_{600} + 6.89 \times 10^5$ 。结论 低频超声法是一种较好的结核分枝杆菌菌悬液制备方法, 结合 OD₆₀₀ 值测定, 可成为一种可靠、快速的结核分枝杆菌定量方法。

[关键词] 结核分枝杆菌; 菌落形成单位; OD₆₀₀; CFU; 定量; 低频超声法; 玻璃珠研磨法

[中图分类号] R378.91⁺1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-9638(2016)03-0150-05

Correlation between optical density and colony forming units of *Mycobacterium tuberculosis* suspension

QIN Yun-he, WANG Yi-hong, GUO Qing-long, WANG Hong-hai, ZHANG Xue-lian (School of Life Science, Fudan University, Shanghai 200438, China)

[Abstract] **Objective** To establish a reliable approach for quantification of colony forming unit (CFU) of *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tb*) by measuring optical density (OD). **Methods** *M. tb* suspension H37Ra was prepared using low-power ultrasonic or glass bead beating methods, and was two-fold serially diluted, OD at 600nm (OD₆₀₀) of each dilution ratio was measured respectively, OD₆₀₀ and dilution curve were analyzed to determine the optimum approach for preparing bacterial suspension, linear range of OD₆₀₀, as well as linear relationship between OD₆₀₀ and CFU. **Results** OD₆₀₀ was 0.1-0.6, linear regression analysis of OD₆₀₀ and dilution ratio within linear range revealed that correlation coefficient (R^2) of glass bead beating and low-power ultrasonic methods were 0.98 and 1.00 respectively, both presented a good correlation, low-power ultrasonic method was better than glass bead beating method, bacterial suspension dispersed more evenly. Linear regression analysis results of OD₆₀₀ and CFU values showed that the regression equation of glass bead beating method and low-power ultrasonic method were $CFU = 2.35 \times 10^7 \times OD_{600} + 4.42 \times 10^5$ and $CFU = 3.26 \times 10^7 \times OD_{600} + 6.89 \times 10^5$ respectively. **Conclusion** Low-power ultrasonic method is a good method for preparation of *M. tb* suspension, combined the measurement of OD₆₀₀ value, it can be a reliable and rapid method for quantitative analysis of *M. tb*.

[Key words] *Mycobacterium tuberculosis*; colony forming unit; OD₆₀₀; CFU; quantification; low-power ultrasonic method; glass bead beating method

[Chin J Infect Control, 2016, 15(3): 150-154]

[收稿日期] 2015-07-25

[基金项目] 上海市科技支撑项目(15431900200)

[作者简介] 秦云贺(1988-), 男(汉族), 河南省新乡市人, 硕士, 主要从事新型抗结核药物发现和机制研究。

[通信作者] 张雪莲 E-mail: xuelianzhang@fudan.edu.cn

结核病(tuberculosis, TB)是由结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*, *M. tb*)引起的传染性疾病,该病已成为危害人类健康的“头号杀手”^[1]。近年来,随着卡介苗(BCG)免疫保护力下降^[2]、人类免疫缺陷病毒(HIV)全球流行^[3],以及耐药结核病^[4](drug-resistant tuberculosis, DR-TB)的出现,使得发现新型免疫保护性抗原、新型抗结核药物,以及细菌与宿主细胞相互作用等结核分枝杆菌基础性研究和相关应用愈加重要,其中药物敏感试验、细胞侵染试验^[5]及动物感染实验^[6]等均需准确测定结核分枝杆菌的菌量。目前,结核分枝杆菌定量方法主要包括CFU计数法、麦氏比浊法及光密度法^[7-8],CFU计数方法相对准确性高,但周期长,不适用于实际研究中菌液浓度的快速测定;麦氏比浊法是经典的应用于普通微生物浓度测定的方法,该方法用于结核分枝杆菌定量可操作性和重复性差;基于光密度值的定量方法具有简单、便捷、快速的优势,是一种相对实用的定量方法。但由于结核分枝杆菌生长呈颗粒状,菌悬液制备方法以及实验室检测仪器、细菌培养方法等方面的差异,导致该方法缺乏统一的定量标准,需要探索一种简便可靠的方法,便于结核分枝杆菌定量。本研究对比分析低频超声法及玻璃珠研磨法两种菌悬液制备方法,对菌悬液制备方法、菌悬液600 nm处的光密度值(OD600值)与稀释倍数关系、OD600值与CFU关系等进行分析 and 探讨。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 菌株 结核分枝杆菌菌株 H37Ra 为本实验室保存。

1.1.2 仪器和试剂 酶标仪(BioTek)、水浴超声仪(Bioruptor Next Gen UCD-300)、涡旋振荡器(SCILOGEX MX-S)、尼康正置荧光显微镜(Nikon)、4.0 mm 玻璃珠(复旦大学材料供应中心)、96孔板(上海睿安生物科技有限公司)、Middlebrook 7H9 和 7H10(Difco)、Tween80 和甘油(国药集团化学试剂有限公司)、ADC(0.5%牛血清白蛋白、0.2%葡萄糖、0.85%氯化钠),所用化学试剂均为国产分析纯。

1.2 方 法

1.2.1 结核分枝杆菌 H37Ra 的培养 用接种环于 7H10-10%ADC 固体板划线接种 H37Ra,37 °C 培

养箱中静置培养 2~3 周,备用。

1.2.2 菌悬液制备

1.2.2.1 玻璃珠研磨法 接种环刮取 3 环于 7H10-ADC 固体板上生长 2~3 周的菌体,转移至含 800 μ L 液体培养基(7H9、0.05% Tween80、0.5%甘油、10% ADC)的 2.0 mL EP 管中,加入 5 粒 4.0 mm 磁珠,置于涡旋振荡器上,工作速率调至第三档,涡旋 5 min 左右。震荡过程中,观察 EP 管中液体是否充分震悬并随时调整振荡角度,肉眼观察无可见菌块且悬液分散均匀停止振荡,转移至含 5.2 mL 液体培养基中,静置 30 min,取上层菌液,在显微镜下观察玻璃珠处理后菌体分散状况。

1.2.2.2 低频超声法 接种环刮取 3 环于 Middlebrook 7H10 固体板(Middlebrook 7H10、0.5%甘油、10% ADC)上生长 2~3 周的菌体,转移至含 6.0 mL 液体培养基中,将菌液分装于无菌 2.0 mL EP 管中,500 μ L/管,水浴超声仪功率调至“LOW”状态,工作 15 s,停 15 s,共 8 个循环,勿过度延长超声时间,200 g 10 min 低速离心,取上层菌悬液,在显微镜下观察菌液超声处理前后分散情况。

1.2.3 CFU 计数 将制备的菌悬液进行梯度稀释,分别取梯度稀释的菌悬液 200 μ L 涂布 Middlebrook 7H10 固体板,37 °C 静置培养 3~4 周,分别计算 CFU,每个稀释度的菌悬液接种 3 个平板。

1.2.4 菌悬液光密度值测定

1.2.4.1 菌悬液可见光区波长扫描 以液体培养基为本底,含适量浓度 H37Ra 的菌悬液为样品,利用酶标仪扫描其(400~800)nm 波长范围内的吸收曲线,间隔为 1 nm,并校正光程,通过菌液吸收曲线确定 600 nm 是否为其较好的吸光度测定波长。

1.2.4.2 酶标仪测定菌悬液光密度值 分别将两种方法制备的菌悬液进行 2 倍梯度稀释,连续稀释 4 个梯度(2、4、8、16 倍)并利用酶标仪测定每个稀释梯度 $\lambda = 600$ nm 处的光密度值,每个梯度设置 3 个复孔,每种菌悬液均重复两次。

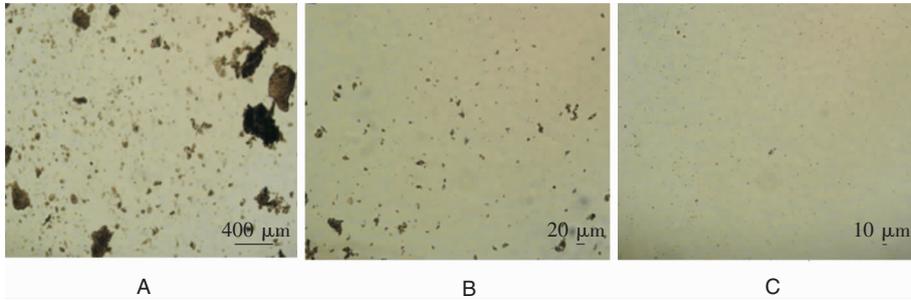
1.3 数据处理 所得光密度值均采用均值 \pm 标准偏差表示,利用 Origin 8.0 数据处理软件分析 OD600 与稀释倍数关系,并确定 OD600 线性范围;根据 CFU 计数结果,进行 CFU 与 OD600 回归分析。

2 结 果

2.1 菌悬液制备 结核分枝杆菌生长易积聚,常规方法不易将其均匀分散,本实验采用两种细菌分散

方法对结核分枝杆菌 H37Ra 株进行处理,结果显示玻璃珠研磨结核分枝杆菌 5 min 可增加细菌的分散度,但分散细菌团块沉降率较大,需静置 30 min;低

频水浴超声处理结核分枝杆菌后明显增加菌液的分散度,且低频超声法细菌悬液较为均匀。见图 1。



A: 未处理; B: 玻璃珠研磨法处理后; C: 低频超声法处理后

图 1 结核分枝杆菌菌悬液经不同方法处理后显微镜下分散状况(×40)

Figure 1 Microscopically observed dispersion status of *M. tb* suspension prepared with different methods(×40)

2.2 CFU 计数 将两种方法制备并稀释的结核分枝杆菌菌悬液分别涂布 Middlebrook7H10 固体培养板,37 °C 培养 3~4 周后计菌落数,低频超声分散法菌落数比玻璃珠研磨法菌落数多,但两种方法制备的菌悬液在同一稀释倍数下细菌数无数量级差异。

2.3 菌悬液可见光区波长扫描图 根据测定波长选择原则:选择斜率较小处的波长,以保证其稳定性;具有适当的吸收值,确保其灵敏度,菌悬液在可见光区 400~800 nm 波长范围内,无最大吸收,菌悬液测定中 500~650 nm 内测定波长均符合要求,本研究采用 600 nm 测定波长。见图 2。

2.4 OD600 值 酶标仪测定两种不同稀释梯度的菌悬液 OD600 值,结果显示两种方法制备的菌悬液吸光值均具有明显的梯度依赖性,其线性相关区间 OD600 值为 0.1~0.6。见表 1。线性范围内 OD600 值与稀释倍数线性回归分析,结果显示玻璃珠研磨法和低频超声法相关系数(R^2)分别为 0.98、1.00,均呈良好的相关性。见图 3。低频超声法制备的菌悬液多次测定结果重复性及稳定性好于玻璃珠研磨法。

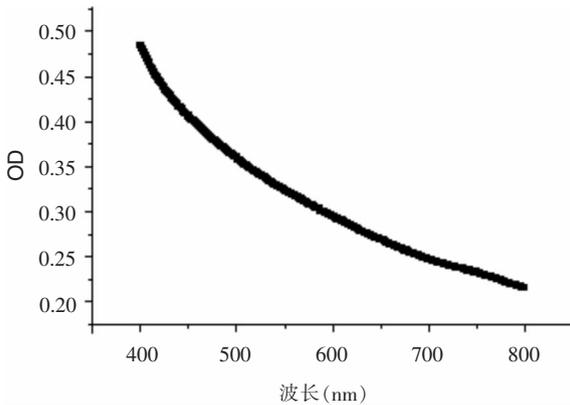


表 1 两种不同稀释梯度结核分枝杆菌菌悬液 OD600 值

Table 1 OD600 of *M. tb* suspension at two different dilution ratios

稀释倍数	玻璃珠研磨法	低频超声法
1	1.89 ± 0.15	1.90 ± 0.09
2	0.68 ± 0.07	0.76 ± 0.02
4	0.37 ± 0.06	0.37 ± 0.03
8	0.14 ± 0.03	0.17 ± 0.01
16	0.08 ± 0.01	0.08 ± 0.01

图 2 可见光区结核分枝杆菌 H37Ra 的光密度值

Figure 2 OD of *M. tb* H37Ra in the visible light range

2.5 OD600 值与 CFU 值回归分析 对 OD600 值与 CFU 值进行线性回归分析,结果显示玻璃珠研磨法和低频超声法回归方程分别是: $CFU = 2.35 \times 10^7 \times OD600 + 4.42 \times 10^5$ 、 $CFU = 3.26 \times 10^7 \times OD600 + 6.89 \times 10^5$ 。

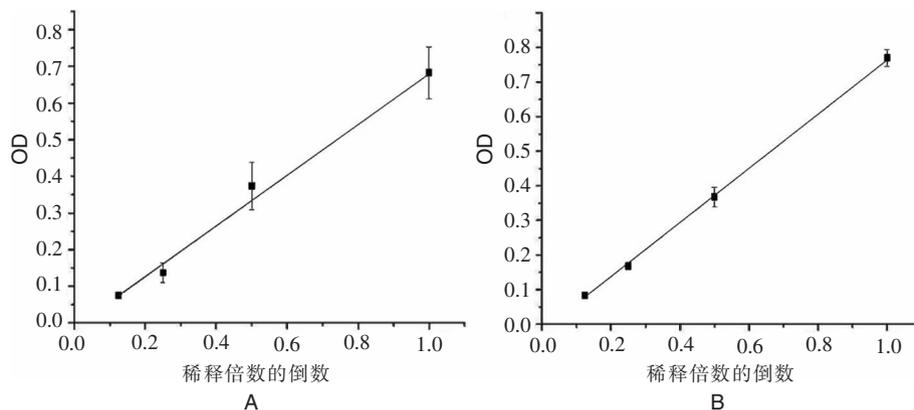
A: 玻璃珠研磨法 ($R^2 = 0.98$); B: 低频超声法 ($R^2 = 1.00$)

图 3 两种方法制备的结核分枝杆菌悬液 OD600 值与稀释倍数线性关系

Figure 3 Linear relationship between OD600 and dilution ratio of *M. tb* suspension prepared with two different methods

3 讨论

结核分枝杆菌细胞壁脂质含量较高,在液体或固体培养基培养下,细菌均呈颗粒状,因此在进行结核分枝杆菌基础研究和临床药物敏感性测定中,细菌准确定量是一个影响结果稳定性的重要因素。CFU 计数、麦氏比浊法、称重法等传统结核杆菌定量方法时间周期长,可操作性及重复性差。分光光度计的操作简单、灵敏度高,测定结果准确度和重复性好,因此紫外-可见分光光度法测定细菌悬液的光密度值成为一种细菌定量的快速、实用的方法,然而结核杆菌呈颗粒状生长的特点使得光密度细菌定量法的稳定性受到很大影响,制定一套标准化的结核杆菌 OD600 值与 CFU 关联方法具有重要的应用价值。Peñuelas-Urquides 等^[9]曾对光密度法进行了初步探索,对结核分枝杆菌 H37Rv(ATCC27294) CFU 值和菌悬液 OD600 值关联性进行分析,结果显示 OD600 值为 0.39 时,其 CFU 数值为 1.97×10^6 /mL。本研究立足于实验室条件,对比分析玻璃珠研磨法和低频超声法两种方法,计算 OD600 值与细菌 CFU 计数之间的函数关系,确定了不同制备方法获得的菌悬液光密度值与细菌数量对应关系。

本研究中采用了低频超声法分散细菌,CFU 计数结果表明低频率超声不会导致细菌破裂,对结核分枝杆菌活力没有影响,其结果高于玻璃珠研磨法所获得菌悬液 CFU 数量。与传统的玻璃珠研磨法相比,低频超声法制备的菌悬液分散度高、菌体多单个存在。实验中玻璃珠研磨菌体 5 min 后采用 30 min 静置而非离心方法,主要由于玻璃珠研磨后,

细菌的颗粒依然比较大,低速离心会严重降低菌悬液中细菌数量。另外,在 OD600 值测定中,低频超声法具有较高重复性,而玻璃珠研磨法所获得菌悬液沉降较快,同一样品的不同时间测定结果偏差很大。

本实验表明,两种方法均可用于结核分枝杆菌的菌悬液制备,低频超声法比玻璃珠研磨法重复性好、菌体分散良好,在进行结核分枝杆菌基因敲除株、重组株构建等试验制备感受态细菌时,可采用低频超声法获得较为均一的菌悬液,有利于电转外源 DNA 和后期阳性细菌克隆的筛选;对细菌数量要求较为精确的实验,如药敏试验也可采用低频超声法制备菌悬液。值得注意的是,在使用玻璃珠分散结核分枝杆菌时,要避免因菌悬液沉降较快,而导致同一样品不同时间测定结果之间的偏差。同时由于各个实验室使用的振荡器或水浴超声仪的型号不同,在制备菌悬液时,需要根据仪器震荡或超声频率的不同,调整制备菌悬液的具体操作时间和频率。

结核分枝杆菌的准确定量具有重要的研究意义,本研究中所采用的 OD600 值与 CFU 关联方法具有普遍适用性,低频超声法可操作性和重复性好,可以为各个实验室建立基于 OD600 值的结核分枝杆菌定量标准提供重要的参考。

[参考文献]

- [1] Paulson T. Epidemiology: a mortal foe[J]. Nature, 2013, 502(7470): S2 - S3.
- [2] Nankabirwa V, Tumwine JK, Mugaba PM, et al. Child survival and BCG vaccination: a community based prospective cohort study in Uganda[J]. BMC Public Health, 2015, 15:

- 175.
- [3] World Health Organization. Global tuberculosis report 2014 [M]. WHO, 2014.
- [4] Udwadia ZF, Amale RA, Ajbani KK, et al. Totally drug-resistant tuberculosis in India[J]. Clin Infect Dis, 2012, 54(4): 579 - 581.
- [5] Mishra BB, Rathinam VA, Martens GW, et al. Nitric oxide controls the immunopathology of tuberculosis by inhibiting NLRP3 inflammasome-dependent processing of IL-1 β [J]. Nat Immunol, 2013, 14(1): 52 - 60.
- [6] 王应辉, 王洪海, 曹健, 等. 潜伏性结核分枝杆菌感染动物模型[J]. 中国感染控制杂志, 2011, 10(4): 312 - 315.
- [7] Iona E, Giannoni F, Pardini M, et al. Metronidazole plus rifampin sterilizes long-term dormant *Mycobacterium tuberculosis* [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2007, 51(4): 1537 - 1540.
- [8] Taneja NK, Tyagi JS. Resazurin reduction assays for screening of anti-tubercular compounds against dormant and actively growing *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis* BCG and *Mycobacterium smegmatis* [J]. J Antimicrob Chemother, 2007, 60(2): 288 - 293.
- [9] Peñuelas-Urquides K, Villarreal-Treviño L, Silva-Ramírez B, et al. Measuring of *Mycobacterium tuberculosis* growth. A correlation of the optical measurements with colony forming units [J]. Braz J Microbiol, 2013, 44(1): 287 - 290.

(本文编辑:豆清娅)

· 书 讯 ·

《医院感染病诊断》征订通知

《医院感染病诊断》将于 2016 年 5 月由人民卫生出版社出版。本书由南方医科大学南方医院汪能平教授为主编,孙树梅、彭劼与张亚莉教授为副主编。

全书分五篇,共 70 余万字。第一篇为总论,介绍医院感染有关的基础性的共性认识;第二篇详细介绍诊断相关理论与实践;第三篇介绍常见的近 30 种病原微生物及其医院感染的微生物学、流行病学知识,以及病原学诊断特点;第四篇介绍医疗器械相关感染、内镜相关感染、血液与血制品相关感染、血液与腹膜透析相关感染、器官移植与各类植入物相关感染等;第五篇扼要介绍医务人员与实验室工作人员职业性感染的现状。

全书文字流畅,表达清晰,深入浅出,尤其注重介绍国内外诊断的新经验,无论是对医院管理人员、医院感染专(兼)职人员,还是临床与微生物实验室的医务人员,均具有一定的参考价值。欢迎大家订阅。

本书 ISBN:978 - 7 - 11721880 - 1

定价:128 元/本

购书联系人:人民卫生出版社刘佳经理

电话:010 - 59787226;13910668535