

裂解甲基化气相色谱法区别不产色 分支杆菌菌群的研究

张 寅 庄玉辉

(三〇九医院结核中心研究室 北京 100091)

摘要 应用新的气相色谱技术——裂解甲基化法解析了不产色分支杆菌菌群的细胞脂类组分,结果表明,这个方法能对该群7种细菌进行特异性区分。其特点是在高温裂解的瞬间完成酯化反应,长链大分子的支菌酸(50~80个碳原子)断裂成脂肪酸碎片 $C_{24,0}$ 和 $C_{26,0}$ 流出。裂解甲基化法分析快捷,谱图重现性好,具有推广应用的价值。

关键词 气相色谱法,裂解甲基化,不产色分支杆菌菌群

1 前言

多年来,人们一直尝试各种化合物衍生化方法,以提高气相色谱(GC)分析前处理效率。新近发展的一种气相色谱技术——裂解甲基化法,已被用于药物检测、高分子化学及法医医学领域^[1]。其特点是将待测样品与烷基化试剂氢氧化四甲(丁)铵共混,在色谱裂解炉的高温下瞬间裂解,断裂后的碎片小分子酸、醇、胺、酚等即刻发生酯化,从而很容易用色谱法分离。我们首次在国内将这一方法用于微生物样品——分支杆菌属的解析^[2]。本文报道了对同属于Runyon I 群的7种不产色分支杆菌进行区别鉴定的结果。

2 实验部分

2.1 菌种

Runyon I 群分支杆菌:不产色分支杆菌(*M. nonchromogenicum*)、土分支杆菌(*M. terrae*)、次要分支杆菌(*M. triviale*)、鸟分支杆菌(*M. avium*)、胞内分支杆菌(*M. intracellulare*)、胃分支杆菌(*M. gastrii*)、蛙分支杆菌(*M. xenopi*)及对照菌瘰癧分支杆菌(*M. scrofulaceum*, Runyon I 群菌),购自卫生部生物制品与药品检定所。

2.2 试剂

内标为 $C_{8,0}$ ~ $C_{22,0}$ 直链饱和及部分不饱和脂肪酸(FA)甲酯;25%氢氧化四甲铵甲醇液(Tetramethylammonium hydroxide, TMAH),美国Sigma公司。TBSA(10-甲基结核硬脂酸,10-methyl tuberculostearic acid)为质谱定性结果^[3]。

2.3 裂解甲基化

称取粉末状冻干菌体10~30 μg 置于铂金舟中,颗粒状及成团菌块需碾碎,注以1~2 μL 的TMAH试剂,充分浸湿菌体后进行裂解。

2.4 仪器与工作条件

岛津气相色谱仪GC-14A,微处理机C-R4A,管炉式裂解器PYR-2A,FID检测器,25米石英毛细管柱(OV-1)。裂解温度770 $^{\circ}\text{C}$,保温块温度175 $^{\circ}\text{C}$,裂解时间20秒,汽化室及检测器温度分别为280 $^{\circ}\text{C}$ 、250 $^{\circ}\text{C}$,程序升温170 $^{\circ}\text{C}$ $\xrightarrow{15^{\circ}\text{C}/\text{min}}$ 250 $^{\circ}\text{C}$ $\xrightarrow{3^{\circ}\text{C}/\text{min}}$ 280 $^{\circ}\text{C}$ (10min)。载气0.75 kg/cm^2 ,尾气、空气及氢气0.5 kg/cm^2 。0.5min开始分流,分流比50:1。

3 结果

图1为不产色分支杆菌菌群及对照菌的裂解甲基化GC图谱。我们对 $C_{22,0}$ 前所有脂肪酸组分的峰面积进行了百分比含量归一化。所采用的谱图识别

的定性、定量指标是：一组三个相邻脂肪酸 $C_{18:1}$ 、 $C_{18:0}$ 及 TBSA 峰高之间的比例；脂肪酸 $C_{19:0}$ 、 $C_{22:0}$ 的含量；支菌酸碎片 $C_{24:0}$ 和 $C_{26:0}$ 的峰高关系；

$aC_{18:1}$ 的检出。按上述指标将本群分支杆菌鉴别的要点列于表 1 中。

表 1 不产色分支杆菌菌群及对照菌鉴别表

菌种名称	色谱鉴别特征
鸟分支杆菌	$TBSA > C_{18:0} > C_{18:1}$, $C_{18:1}$ 峰相对较低, TBSA 峰相对较高, $C_{26:0} > C_{24:0}$
胞内分支杆菌	$TBSA > C_{18:1} > C_{18:0}$, $C_{24:0} > C_{26:0}$
瘰癧分支杆菌	$C_{18:0} > C_{18:1} > TBSA$, $C_{24:0} > C_{26:0}$, 检出 $aC_{18:1}$
土分支杆菌	$C_{18:0} > C_{18:1} > TBSA$, $C_{26:0} > C_{24:0}$
次要分支杆菌	$TBSA > C_{18:0} > C_{18:1}$, $C_{24:0} > C_{26:0}$
不产色分支杆菌	$C_{18:1} > C_{18:0} > TBSA$, $C_{24:0} > C_{26:0}$
蛙分支杆菌	$TBSA > C_{18:1} > C_{18:0}$, $C_{24:0} > C_{26:0}$, $C_{19:0}$ 峰较高
胃分支杆菌	$C_{18:1} > C_{18:0} > TBSA$, $C_{24:0} > C_{26:0}$, $C_{22:0}$ 为强峰

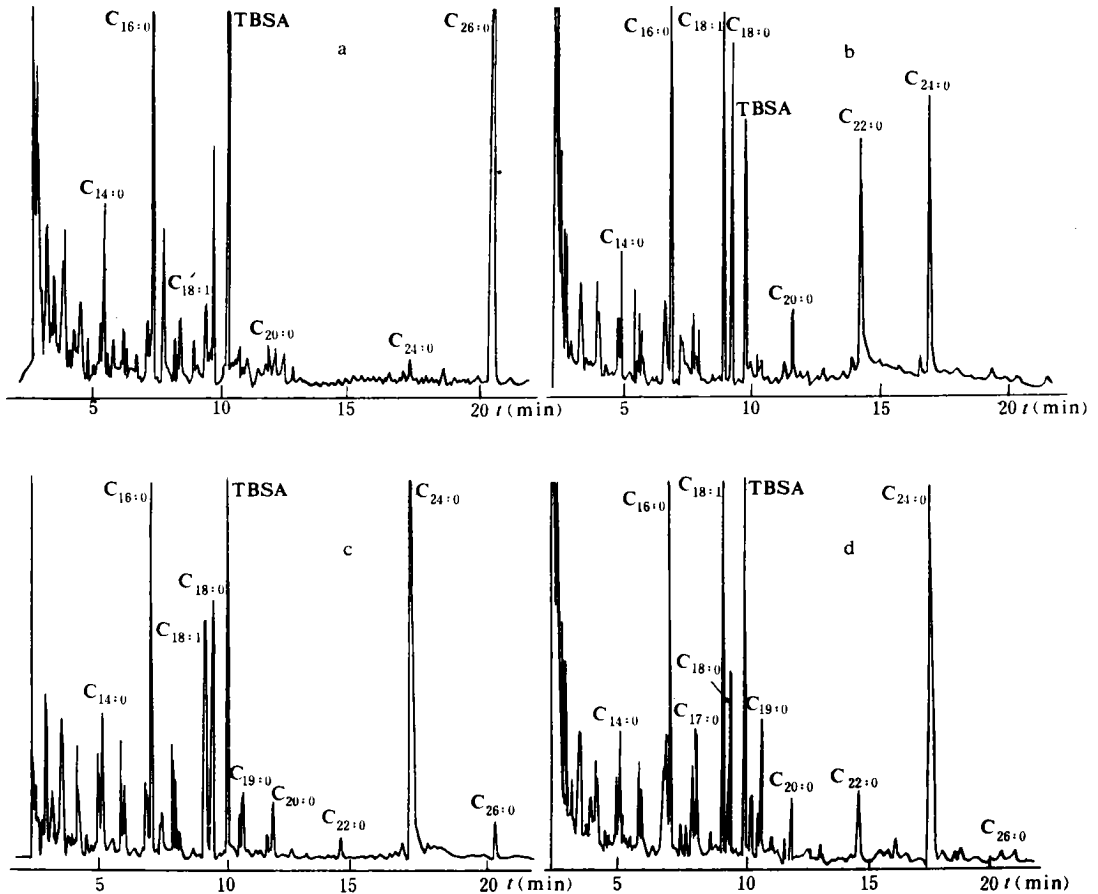


图 1 不产色分支杆菌菌群及对照菌裂解甲基化 GC 图谱

- a. 鸟分支杆菌, b. 胃分支杆菌, c. 胞内分支杆菌, d. 蛙分支杆菌, e. 次要分支杆菌, f. 土分支杆菌, g. 不产色分支杆菌, h. 瘰癧分支杆菌。

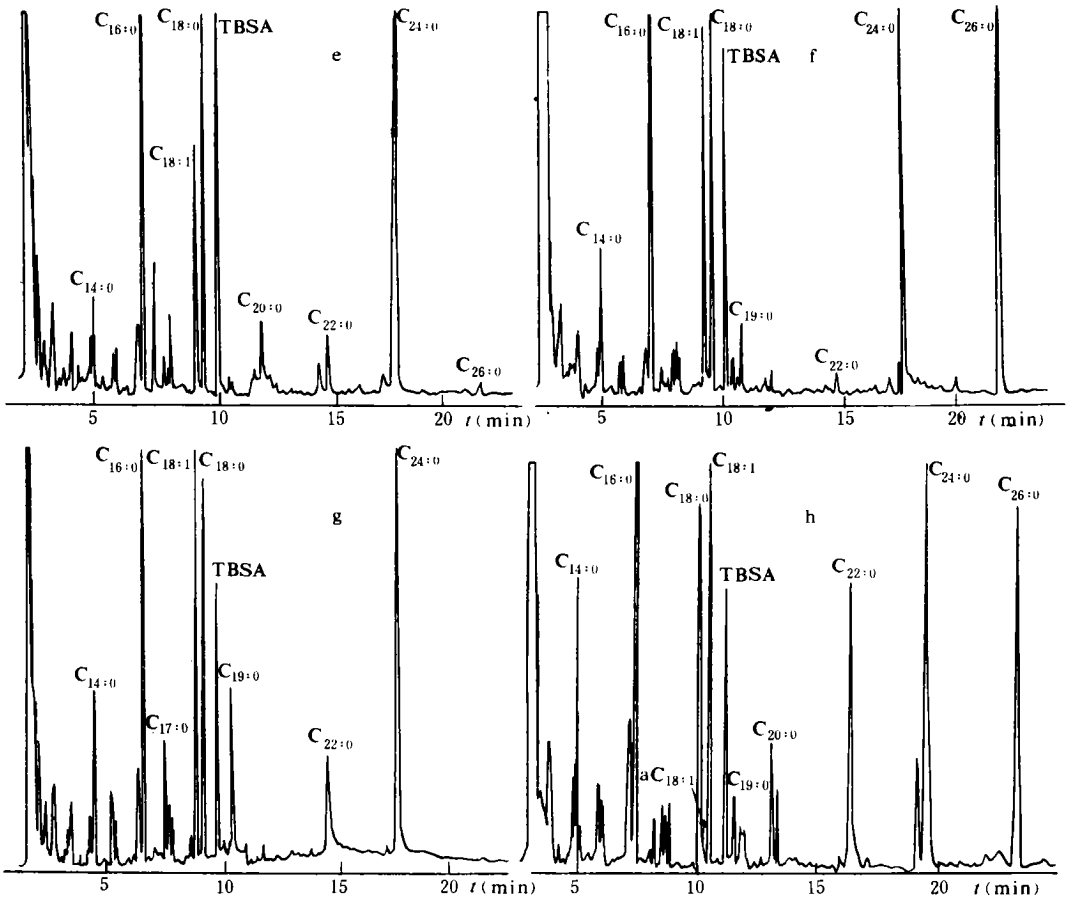


图 1(续) 不产色分支杆菌菌群及对照菌裂解甲基化 GC 图谱

a. 鸟分支杆菌, b. 胃分支杆菌, c. 胞内分支杆菌, d. 蛙分支杆菌, e. 次要分支杆菌,

f. 土分支杆菌, g. 不产色分支杆菌, h. 瘰癧分支杆菌。

4 讨论

分支杆菌属按 Runyon 分群法分为四群, 其中的 Runyon III 群菌为不产色菌, 特征是无无论光照与否均无色素产生, 故照光产色实验是鉴定本属细菌的一个指标, 而进一步区别本群中菌仍需多项生化反应试验。本群菌包含了两个重要的分支杆菌复合体, 即致病的鸟-胞内-分支杆菌复合体和非致病的土-次要-不产色分支杆菌复合体。其中鸟-胞内分支杆菌的感染是目前国外报道的爱滋病死亡病例中最常见的并发感染, 约占 5%~7.5%^[4]。所以, 提供一种快捷有效的菌种鉴定方法具有临床及流行病学意义。

利用气相色谱对细菌进行解析以获取菌体特异性“指纹”图的技术, 目前在用于菌型鉴定的各种新方法中具有独特的地位。传统手段包括细胞 FA 提

取测定法和裂解色谱法, 前者特异性、重现性好, 但衍生化步骤繁琐; 后者快速, 谱图信息丰富, 但重现性不佳。后来曾出现过称为反应气相色谱 (Reaction-GC) 的技术, 在安瓶中加入烷基化试剂 TMAH 与样品, 置高温炉里反应, 快速酯化后进样, 但效果仍不理想^[5]。新近产生的裂解甲基化气相色谱技术集中了前两种方法的优点, 即在高温快速裂解的同时完成特异组分(脂类)的甲基化, 而且重现性良好。

鸟分支杆菌的重要相邻 FA 峰型为 TBSA > C_{18:0} > C_{18:1}, 且 TBSA 峰高于 C_{18:1} 峰, 与我们采取 FA 提取法测得的谱图相吻合^[6]。

从表 1 中可看出, 我们所提出的分类指标完全能够将所测试的菌种在获纯培养后一次区分开来。
致谢 本文承蒙谭立研究员提出宝贵意见, 深表谢忱。

参 考 文 献

(B)

- 1 Chatlinor J M. J Anal Appl Pyrolysis, 1989,16:323
- 2 张 寅、庄玉辉等. 中国化学会第七届分析与应用裂解学术会论文集,成都,1992:82
- 3 Chen Zhihang, Zhang Yin. BCEIA, Beijing, 1991, 129
- 4 庄玉辉. 中国防痨杂志,1994,4:185
- 5 Ohashi D K *et al.* J Clin Microbiol, 1977,6(5):469
- 6 张 寅,庄玉辉等. 微生物学报,1991,31(3):187

Differentiation of Nonphotochromogens Mycobacteria with Pyrolysis-Methylation Gas Chromatography

Zhang Yin and Zhuang Yuhui

(Tuberculosis Research Lab., 309th Hospital, Beijing, 100091)

A new gas chromatography technique, pyrolysis-methylation, has been applied to analyse cellular lipid components of 7 nonphotochromogens mycobacteria. All the tested species and mycobacteria complex could be differentiated rapidly and specifically.

Key words gas chromatography, pyrolysis methylation, nonphotochromogens mycobacteria

欢迎订阅《色谱》(1996年)

《色谱》(ISSN 1000-8713,国内统一刊号 CN 21-1186/O6)是中国科学院和中国化学会共同主办的专业性学术期刊,1984年创刊,报道我国色谱学科的最新科研成果,反映国内外色谱学科前沿与进展,介绍色谱基础理论及其在石油、煤炭、化工、能源、冶金、轻工、食品、制药、化学、生化、医疗、环保、防疫、公安、农业、商检等部门的应用情况。设有研究报告、研究简报、综述与专论、知识介绍、讲座、实验新技术、经验交流、应用实例、来稿摘登、书评与书讯、国内学术活动简讯(包括会议征文及报道)等多种栏目,适于广大分析工作者及大专院校师生阅读,也是图书、情报部门必备资料。

《色谱》是我国自然科学核心期刊,已被美、英等国和国内十余种刊物的检索系统收录。从1986年起已连续9年入选权威文摘——美国《化学文摘》(CA)“千种表”(即该年度摘引量最大的一千种期刊表)。

《色谱》为双月刊,国内单价4.5元,全年(含邮费)27元。邮发代号8-43,请在全国各地邮局订阅(有的省市地区邮局印发的期刊订购目录可能有遗漏,不影响订阅),订购时务必写明《色谱》及其代号8-43。

未在邮局订到者可直接向《色谱》编辑部补订。单位补订享受八折优惠(全年21.6元),个人补订享受半价优惠(全年13.5元)。补订办法:请从邮局汇款至大连市中山路161号《色谱》编辑部(邮编:116012),写明订户单位、详细地址、收刊人姓名、邮编及补订份数,收到单位汇款后即寄收据。

《色谱》再次入选“CA 千种表”

据美国《化学文摘资料来源索引》季刊(Cheical Abstracts Service Index, Quarterly, No. 4, 1994)公布的资料(编纂年度为1993年7月~1994年6月),《色谱》再次入选“CA 千种表”,至此《色谱》已连续9年入选。