

抗酸分枝杆菌和相关菌全细胞枝菌酸 甲基酯的薄层分析

庄玉辉 张寅 韩元华

(解放军 309 医院结核中心研究室, 北京)

刘志恒 阮继生

(中国科学院微生物研究所, 北京)

用单向薄层层析方法对 22 种抗酸分枝杆菌及相关细菌的全细胞枝菌酸甲基酯进行了分析。结果表明,人型结核杆菌、牛型结核杆菌、堪萨斯分枝杆菌、海分枝杆菌和胃分枝杆菌的图谱特征相似,由 α 、甲氧基和酮基枝菌酸酯组成,还有两种未知成分 I 和 J。微黄分枝杆菌、草分枝杆菌、鸟分枝杆菌、胞内分枝杆菌、蛙分枝杆菌和不产色分枝杆菌等均由带 α 、酮基和蜡脂枝菌酸组成。其它菌种的层析图谱各不相同。诺卡氏菌、红球菌和棒杆菌的图谱较分枝杆菌属简单,主要含有 α 枝菌酸,又因其 R_f 值不同,可以将这 4 种菌属区别开。从肺结核患者痰中分离出来的 9 株标本枝菌酸图谱与标准人型结核杆菌相同,这和用标准化规程进行鉴定的结果一致。我们认为单向薄层层析对于抗酸分枝杆菌的分类和鉴定具有一定的意义。

关键词 枝菌酸甲基酯;分枝杆菌;薄层分析

磷脂、脂肪酸和蜡脂 D 是抗酸分枝杆菌含量最多的类脂,约占菌体细胞壁成分的 60%,而枝菌酸则是这类菌体类脂中最高级的高级脂肪酸,也是该属重要的生物学特性之一。Jenkins^[1] 在 1969 年最先用薄层层析(TLC)分析了堪萨斯分枝杆菌(*Mycobacterium kansasii*)等 7 种分枝杆菌组分。Tsukamura^[2] (1975) 用同位素扫描的方法分析了 20 种分枝杆菌枝菌酸的(TLC)图谱,发现有 5 个斑点且有种间差别。Valero^[3] 等对此也进行了报道。Dobson 和 Minnikin^[4,5] 综合了 50 种分枝杆菌的特点按其所含枝菌酸斑点的差异分成 11 个组,用以评价其在该属细菌分类与鉴定上的意义。国内刘志恒^[6,9] 等已将这一方法用于放线菌的分类。但迄今分枝杆菌枝菌酸甲基酯的(TLC)图谱尚未见详细报道。本文将 22 种分枝杆菌及相关

菌和 9 株临床分离标本的(TLC)分析报告如下。

材料和方法

(一) 菌种来源

表 1 所列分枝杆菌均系中国药品生物制品检定所提供。诺卡氏菌、红球菌和棒杆菌系中国科学院微生物研究所提供。临床分离株系由本院肺结核患者痰中分离。

(二) 菌体制备

抗酸分枝杆菌培养于苏通液体培养基内,除海分枝杆菌(*M. marinum*)培养温度为 28℃ 外,其余均在 37℃ 下培养。快生长菌培养 3—7 天,慢生长菌 2—3 周。星状诺卡氏菌、红球菌和棒杆菌培养于加有酵母浸膏的葡萄糖天门冬液体培养基中,37℃ 下振荡生长 3 天。临床痰标本经处理接种于改良罗氏培养基,2—3 周后刮取菌落。

本文于 1987 年 11 月 12 日收到。

上述培养物加入福尔马林 (1.5% V/V) 灭活或 $1.05\text{kg}/\text{cm}^2$ 灭菌 30 分钟。离心后菌体用蒸馏水洗两次, 菌体低温冷冻干燥后保存备用。

(三) 枝菌酸甲基酯的提取

参照 Minnikin^[7] 报道的细胞酸性水解方法进行。

(四) 枝菌酸甲基酯的薄层层析

在 $10 \times 10\text{cm}$ 的玻璃板上将型号 60HP₂₃₄ 硅胶 (Merck Darmstadt, G. F. R) 加入适量的羧甲基纤维素水溶液 (0.5%) 调和, 铺成 0.5mm 厚的薄板, 室温干燥。硅胶板用前在 110°C 下活化 10 分钟。溶媒推展系统采用石油醚: 丙酮 (95:5, V/V), 室温下行单向层析, 反复推展 5 次, 稍干

后用 10% 磷钼酸乙醇液喷雾 (120°C , 15 分钟) 显色。根据 Minnikin 等报道的结果和已知菌种的层析图谱做标准判读结果。

结果和讨论

抗酸分枝杆菌和相关菌层析图谱主要斑点的 Rf 值是判断和鉴定化合物性质的参考指标之一。有关分枝杆菌和相关菌的枝菌酸酯斑点的 Rf 值尚无详细资料。本文计算 22 种测试菌株主要斑点的 Rf 值, 重复 5 次以上。分别得到: α 基 Rf = 0.60; 甲氧基 Rf = 0.52; α' 基 Rf = 0.55;

表 1 22 种分枝杆菌和相关菌枝菌酸酯组分

Table 1 Mycolate patterns of twenty-two species *Mycobacterium* and related bacteria

菌种名称 Names of species	枝菌酸酯斑点 Spots of mycolate
1. 人型结核杆菌 (<i>M. tuberculosis</i>) 93301	A, B, C, I, J
2. 牛型结核杆菌 (<i>M. bovis</i>) 93302	A, B, C, I, J
3. 偶发分枝杆菌 (<i>M. fortuitum</i>) 93323	A, M, I, J
4. 副偶发分枝杆菌 (<i>M. parafortuitum</i>) 93324	A, C, D, E
5. 金黄分枝杆菌 (<i>M. aurum</i>)	A, A', D, E
6. 耻垢分枝杆菌 (<i>M. smegmatis</i>) 93321	A, A', M, I, K, J
7. 海分枝杆菌 (<i>M. marinum</i>) 93305	A, B, C, I, J
8. 胃分枝杆菌 (<i>M. gastri</i>) 93310	A, B, C, I, J
9. 堪萨斯分枝杆菌 (<i>M. kansasii</i>) 93304	A, B, C, I, J
10. 次要分枝杆菌 (<i>M. triviale</i>) 93313	A, I, J
11. 微黄分枝杆菌 (<i>M. gilvum</i>) 93322	A, L, C, D, E
12. 草分枝杆菌 (<i>M. phlei</i>) 93318	A, L, C, D, E
13. 胞内分枝杆菌 (<i>M. intracellulare</i>) 93314	A, L, C, D, E
14. 鸟分枝杆菌 (<i>M. avium</i>) 93315	A, L, C, D, E
15. 猿分枝杆菌 (<i>M. simiae</i>) 93306	A, A', N, C, I, J
16. 斯氏分枝杆菌 (<i>M. szulgai</i>) 93309	A, O, C, P, D, E
17. 瘰癧分枝杆菌 (<i>M. scrofulaceum</i>) 93307	A, C, P, D, E
18. 牝牛分枝杆菌 (<i>M. vaccae</i>) 93319	A, A', O, C, P, D, E
19. 土分枝杆菌 (<i>M. terrae</i>) 93312	A, C, D, E
20. 迪氏分枝杆菌 (<i>M. diernhoferi</i>) 93320	A, C, D, E
21. 蛙分枝杆菌 (<i>M. xenopi</i>)	A, L, C, D, E
22. 不产色分枝杆菌 (<i>M. nonchromogenicum</i>) 93311	A, L, C, D, E
23. 棒杆菌 (<i>Corynebacterium</i> sp.) A. 891	A
24. 红球菌 (<i>Rhodococcus</i> sp.) R. 372	A
25. 星状诺卡氏菌 (<i>Nocardia asteroides</i>) 3318	A
I. 临床分离株 (<i>Mycobacterium</i> sp.) CS09	A, B, C, I, J
II. 临床分离株 (<i>Mycobacterium</i> sp.) CS26	A, B, C, I, J
III. 临床分离株 (<i>Mycobacterium</i> sp.) CS32	A, B, C, I, J
IV. 临床分离株 (<i>Mycobacterium</i> sp.) CS33	A, B, C, I, J

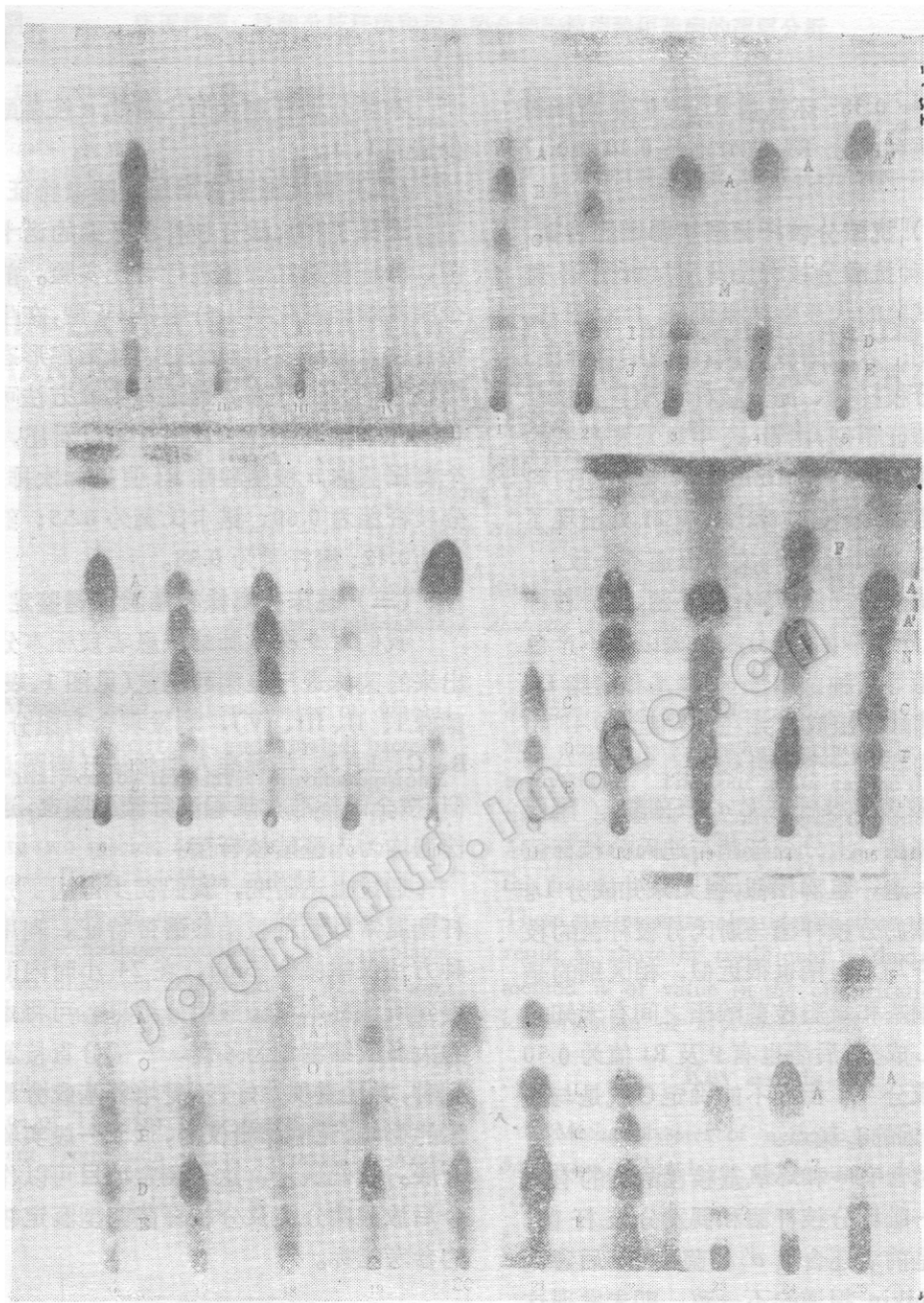


图1 分枝杆菌和相关细菌全细胞枝菌酸甲基酯单向薄层分析图谱

Fig. 1 TLC pattern of whole-cell mycolic acid methyl esters of *Mycobacterium* and related bacteria

Developing system: light petroleum (b. p. 60—90°C): acetone (95:5)×5

A, A': α , α' -mycolates; B: methoxy-mycolates; C: keto-mycolates; M: epoxy-mycolates; D, E: wax ester mycolates (ω -carboxymycolates and 2-icosinol and related alcohols); F: non-hydroxyl fatty acid methyl esters; I, J, K, L, N, O, P: 均为未知成分。菌种编号见表1。

A, A': α , α' -mycolates; B: methoxy-mycolates; C: keto-mycolates; M: epoxy-mycolates; D, E: wax ester mycolates (ω -carboxymycolates and 2-icosinol and related alcohols); F: non-hydroxyl fatty acid methyl esters; I, J, K, L, N, O, P: unknown components. Number of species see table 1.

酮基 Rf = 0.38; 环氧基 Rf = 0.31 蜡脂枝菌酸酯两种成分 Rf 值分别是 0.30 和 0.17 (图 1)。

(一) 抗酸分枝杆菌层析图谱的特征

22 种抗酸分枝杆菌薄层层析图谱斑点 3 次试验的代表性结果见表 1 和图 1。结果表明: 人型结核杆菌、牛型结核杆菌、堪萨斯分枝杆菌、海分枝杆菌和胃分枝杆菌图谱特征相似, 由带 α 、甲氧基和酮基的枝菌酸酯组成, 与 Minnikin^[9] 报道的资料一致。但在 Rf 0.21 和 Rf 0.11 处出现了未知成分 I 和 J, 这与文献报道不一致。

微黄分枝杆菌、草分枝杆菌、鸟分枝杆菌、胞内分枝杆菌、蛙分枝杆菌以及不产色分枝杆菌等 6 种菌由带 α 、酮基和蜡脂 D、E 的枝菌酸酯组成, 并在 Rf 值为 0.48 的位置上均存在一个含量较高的未知成分 L 斑点。微黄分枝杆菌无 α' 枝菌酸。副偶发分枝杆菌、土分枝杆菌与迪氏分枝杆菌基本上与这一组群相似, 但无未知成分 L。另外, 瘰癧分枝杆菌与斯氏分枝杆菌的枝菌酸组分与本组菌也很近似, 相区别的是前者在酮基和蜡脂枝菌酸酯之间有未知的 P, 而无 L 成分; 后者也有 P 及 Rf 值为 0.50 的未知成分 O, 但尚不能确定 O 就是与其 Rf 值相近的 L 斑点。

同时含有 α 和环氧基枝菌酸酯的有两种菌——耻垢分枝杆菌和偶发分枝杆菌, 不同的是前者还含有 α' 枝菌酸酯, 后者则与 Minnikin 报道的不一致, 即未发现这一成分。这是否与被试菌株不同有关尚待证实。

猿分枝杆菌具有较为特异的谱带, 它含有 α 、 α' 和酮基枝菌酸, 还有成分含量较多的 I、J 及 Rf 值在 0.44 的未知成分 N。

金黄分枝杆菌含有 α 、 α' 枝菌酸酯以及微量的蜡脂枝菌酸酯, 缺少酮基枝菌酸酯。

次要分枝杆菌含有大量的 α 枝菌酸及少量的 I、J。

(二) 相关细菌薄层层析图谱特征

选择了和抗酸分枝杆菌亲缘的诺卡氏菌、棒杆菌及红球菌进行对比实验。前 3 个菌属细胞壁化学组分都是 IV 型, 在生物学特性上有许多相似之处, 通常靠形态很难将它们区别开来。通过本实验方法可以将这几个菌属分开。从图 1 可以看出, 四个菌属菌株 α 枝菌酸酯 Rf 值呈梯次排列, 分枝杆菌为 0.60; 诺卡氏菌为 0.55; 红球菌为 0.42; 棒杆菌为 0.38。

(三) 临床分离株枝菌酸图谱鉴定

我们对 9 株从肺结核患者痰标本分离出来的菌株进行枝菌酸测定(见图 1、表 1, 菌株 I、II、III、IV), 均发现含有组分 A、B、C、I、J, 与标准人型结核杆菌图谱相似, 按全国标准化规程进行菌型鉴定, 这 9 株菌均为人型结核杆菌。

通过上述研究, 我们初步得到了分枝杆菌属常见菌种枝菌酸谱带特征。利用这种方法仅需菌体 5mg, 在 24 小时内即可得到所测标本枝菌酸组分结果, 可将本属的大多数细菌划为 6 群, 一部分直接鉴定到种, 并且重现性好, 不受培养基成分等因素的影响, 无需昂贵仪器, 适于一般实验室开展。我们认为, 这一测定项目可以作为今后放线菌分类及分枝杆菌菌型鉴定较好的参考指标。

参 考 文 献

- [1] Jenkins, P. A.: *Tubercle* 50: 85, 1969.
- [2] Tsukamura, M.: *International Journal of Systematic Bacteriology*, 25(3): 271—280, 1975.
- [3] Valero-Guille, P. L. et al.: *J. Applied Bacteriology*, 59: 113—126, 1985.
- [4] Dobson, G. et al.: *Chemical Methods in Bacterial Systematics*, Academic Press, London, 1984.
- [5] Minnikin, D. E. et al.: *Microbiological Classification and Identification*, Academic Press, London, pp. 189—256, 1980.

- [6] Liu Zhiheng et al.: 6th International Symposium on Actinomycetes Biology, Debrecen, Hungary. pp. 605.
- [7] Minnikin, D. E. et al.: *J. Chromatogr.*, 188: 221—233, 1980.
- [8] Minnikin, D. E.: In the Biology of the Mycobacteria. Academic Press, London, pp. 95—184, 1982.
- [9] 刘志恒等：微生物学报, 28(3): 206—210, 1988.

THIN-LAYER CHROMATOGRAPHY OF MYCOLIC ACIDS METHANOLYSATES OF WHOLE-CELL IN *MYCOBACTERIUM* AND RELATED BACTERIA

Zhuang Yuhui Zhang Yin Han Yuanhua
(Tuberculosis Center, 309th Hospital of PLA, Beijing)

Liu Zhiheng Ruan Jisheng
(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing)

Mycolic acid methanolysates of whole-cell in *Mycobacterium* and related bacteria were analysed by thin-layer chromatography. The experimental results show that five of twenty-two species, *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. kansasii*, *M. marinum* and *M. gastri* have similar pattern of mycolates, composed of α -mycolates, methoxymycolates, ketomycolates and two unknown components. *M. gilvum*, *M. phlei*, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. xenopi* and *M. nonchromogenicum* contain α -mycolates, ketomycolates and wax-ester. The patterns of TLC for other tested species are different from each other. *Nocardia*, *Rho-*

dococcus and *Corynebacterium* show a relatively simple pattern which principally contain α -mycolates. The four genus can be differentiated. Spots of mycolic acids of nine strains *Mycobacterium* sp. isolated from patients in this hospital were similar to *M. tuberculosis*. These strains were also identified to the same result as above by traditional methods. The method is of value in the classification and identification of *Mycobacterium*.

Key words

Methanolysates of mycolic acid; *Mycobacterium*; Thin-layer chromatography