

细胞单糖气相色谱图鉴别细菌的研究*

周方 朱厚础** 王令春** 高树德

(军事医学科学院微生物学流行病学研究所, 北京)

本文介绍细胞单糖毛细管柱气相色谱图的绘制方法, 对所得细菌细胞单糖气相色谱图中的某些组分进行分析鉴定, 并借助电子计算机对细菌细胞单糖模式进行聚类分析。用上述方法鉴别了24株(5种)芽孢杆菌, 均得到满意结果。结果表明, 炭疽芽孢杆菌和蜡状芽孢杆菌的单糖图谱有较明显的区别。

关键词 细菌细胞单糖; 气相色谱; 聚类分析

细胞单糖及其衍生物不仅参与基础能量代谢, 而且参与组装生物大分子及超分子亚单位, 是细胞内活性大分子(如核酸、糖蛋白、脂多糖等)及细胞外支持物(如肽聚糖、纤维素等)的一类基本结构单元。分析细菌细胞多糖中的单糖种类和数目还具有重要的分类学意义。例如肽聚糖多见于革兰氏阳性菌而少见於革兰氏阴性菌, 且在前者中, 其结构和组分常因菌而异, 其中单糖组分的不同可反映种间差异^[1]。又如参与O抗原侧链的单糖种类和数目也因种的不同而异^[2]。为深入研究单糖在生物大分子及亚细胞结构中的组成、连结方式及生物学功能, 探索细菌全细胞单糖组分分析的分类学作用, 我们在开展细菌细胞脂肪酸分析的基础上, 又对细胞单糖分析及其在鉴别细菌中的应用进行了探讨。

单糖组分可用气相色谱法分析。戈苏国等^[3]研究红曲霉葡萄糖淀粉酶的糖肽结合方式和钱世钧等^[4]研究根瘤菌胞外酸性多糖的结构时都采用了填充柱气相色谱法分析样品中的单糖组成。毛细管柱气相色谱法样品用量少, 分离效率高, 更适合于致病菌细胞单糖的分析^[5]。

材料和方法

(一) 菌种

实验菌株: 部分为参考菌株, 其余为经实验室定名的菌株。

炭疽芽孢杆菌 (*Bacillus anthracis*) 3-10, 3-15, 3-25, 3-49, 3-54 (强毒株)、3-61, 3-79, 042, 044, 045 (疫苗株)、046, 共11株; 蜡状芽孢杆菌 (*Bacillus cereus*) 064, 065, 313, 071 (参考株)、AS1.126 (中国科学院微生物研究所), 共5株; 枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 212, 213, 312, 314, 221, AS1.88 (中国科学院微生物研究所), 共6株; 短小芽孢杆菌 (*Bacillus pumilus*) 311株; 蕈状芽孢杆菌 (*Bacillus mycoides*) 411株。以上菌株除标明来源者外, 均为本实验室保存的菌株。所有实验菌株都有表型鉴定报告^[6]、全细胞裂解气相色谱鉴别报告^[7]和全细胞脂肪酸分析报告^[8]。

(二) 菌样制备

干燥菌种加肉汤混匀后, 取悬液接种于平板, 37°C 过夜。挑单菌落接种于斜面上, 37°C 过夜。用10ml生理盐水洗下菌苔, 移入三角烧瓶中, 流通蒸汽灭活, 作无菌检查。确实灭活的菌液于8000r/min离

本文于1988年11月9日收到。

* 国家自然科学基金资助的课题。

** 军事医学科学院生物工程研究所。

心 15min。重复洗涤 3 次，沉淀物真空冻干备用。

(三) 全细胞单糖硅烷化衍生物的制备

称 5mg 菌粉，加 3ml 2mol/L HCl-CH₃OH 液，充氮气，85℃ 水解 7h。冷却至室温后通氮气浓缩至原体积的一半，用等体积己烷重复提取脂肪酸甲酯。剩余甲醇液中加适量弱碱性阴离子交换树脂，用力振摇，除去剩余酸性成分。除去树脂，反应液用氮气吹干。残留物加入 1ml 硅烷化试剂 (HMDS:TMCS:Py = 3:1:9)，用力振摇，放置 30min。85℃ 水浴加热 10min。冷却至室温，氮气流吹干。残留物用 0.2ml 己烷溶解，供气相色谱分析用。

标准单糖溶液的配制：精确称取适量标准单糖试剂，配成 0.04mol/L 水溶液，其中包括 α -D-(+)-葡萄糖、D-(一)-核糖、D-(+)-甘露糖、 β -D-(一)-木糖、D-(+)-半乳糖、D-(一)-阿拉伯糖（以上美国 SIGMA 化学公司）、L-(+)-鼠李糖（美国 BDH 公司）、D-岩藻糖（英国 KOCH-LIGHT 公司）、N-乙酰半乳糖胺、N-乙酰葡萄糖胺、N-乙酰胞壁酸（以上美国 SERVA 公司）。另配制同样浓度的肌醇（MERCK 公司）和甘露醇（BDH, LR）水溶液作内标。

硅烷化衍生物试剂：六甲基二硅氮烷 (HMDS, 瑞士 FLUKA 公司)，三甲基氯硅烷 (TMCS, MERCK 公司)，吡啶 (AR, 北京化工)。

(四) 仪器和工作条件

色谱分析用美国 Perkin-Elmer SIGMA 115 型气相色谱，配双氢焰鉴定器、Hewlett-Packard 12m 交联甲基硅酮高效石英毛细管色谱柱。色谱柱工作温度为三阶程序升温：120℃—(2℃/min)—160℃—(1℃/min)—180℃—(6℃/min)—250℃，延续

20min。载气(高纯氮) 2ml/min，分流比 20:1，氢气 30ml/min，空气 300ml/min，纸速为三阶变速 2—5—4mm/min。汽化室和鉴定器温度 270℃。

(五) 聚类分析方法

见文献[9]。

结 果

本实验色谱分析的各种参数是按标准单糖成分分析的需要而设置的。图 1 是标准单糖成分的色谱图。依照上述条件得到了各被试菌株的全细胞单糖色谱图，其中炭疽芽孢杆菌 3-54 株、蜡状芽孢杆菌 AS 1.126 株、枯草芽孢杆菌 AS1.88 株、短小芽孢杆菌 311 株和蕈状芽孢杆菌 411 株的全细胞单糖色谱图如图 2—6 所示。这些图谱明显地呈现出各菌种的特征。

表 1 是 24 株需氧芽孢杆菌全细胞单糖成分分析结果，表中的单糖成分以色谱图中色谱峰的序号表示。由表 1 可见被试各菌种的细胞单糖组成的不同特征。例如，炭疽芽孢杆菌的细胞单糖缺色谱峰 9、21、22 和 23；枯草芽孢杆菌的细胞单糖中，峰 4 和 5 是特有的；短小芽孢杆菌特有峰 19，但缺峰 10；蕈状芽孢杆菌 411 株和蜡状芽孢杆菌 AS1.126 株相比，缺峰 20、21、22 和 23，且峰 13 的含量甚微。

用共色谱法和外标法对细胞单糖色谱图中的色谱峰进行鉴别，得 7 种已知单糖，它们是：核糖(峰 3)、木糖(峰 8)、甘露糖(峰 14)、果糖(峰 15)、半乳糖(峰 16)、葡萄糖(峰 18) 和 N-乙酰半乳糖胺(峰 24)。所有 5 种被试细菌细胞内均含有以上 7 种单糖，但各种单糖的含量却各有不同。例如，短小芽孢杆菌含糖最多，蕈状芽孢杆菌次之，其它三种菌的核糖含量相近；木糖在短小芽孢杆菌细胞中含量最高，枯草芽孢杆菌次之，再次是炭疽芽孢杆菌和蕈状芽

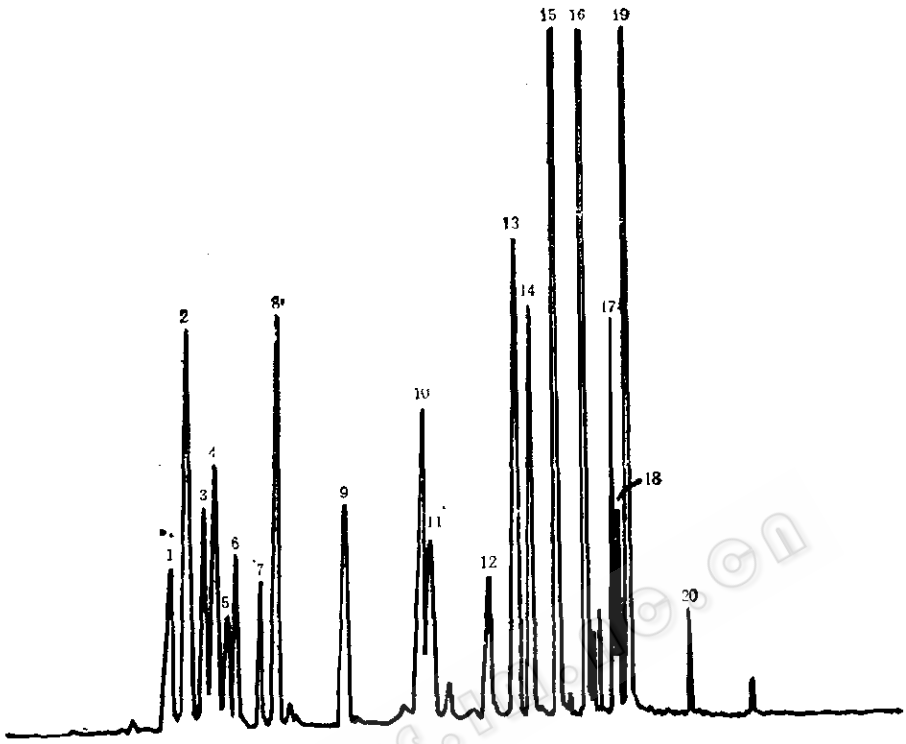


图 1 标准单糖气相色谱图

阿拉伯糖(1,3); 鼠李糖(2,7); 核糖(4,5); 岩藻糖(6,8); 木糖(9); 甘露糖(10); 果糖(11); 半乳糖(12,14); 葡萄糖(13,16); 甘露醇(15); N-乙酰半乳糖胺(17); N-乙酰葡萄糖胺(18); 肌醇(19); N-乙酰胞壁酸(20)

(图 2-6 同)

Fig. 1 The gas-liquid chromatogram of standard monosaccharides

Arab.(1, 3); Rham.(2, 7); Rib.(4, 5); Fuc.(6, 8); Xyl.(9); Man.(10); Fru.(11); Gal.(12, 14); Glc.(13, 16); Mannitol(15); GalNAc. (17); GlcNAc.(18); Inositol (19); murNAc(20)

孢杆菌, 蜡状芽孢杆菌含木糖最少; 甘露糖在炭疽芽孢杆菌细胞中含量最高, 蕈状芽孢杆菌中也较高。其它三种均较低; 含果糖较高的有炭疽芽孢杆菌、蜡状芽孢杆菌和蕈状芽孢杆菌, 而枯草芽孢杆菌和短小芽孢杆菌则较低; 含半乳糖最高的是炭疽芽孢杆菌, 其次是蕈状芽孢杆菌, 其他三种的含量都较低; 含葡萄糖较高是蕈状芽孢杆菌和炭疽芽孢杆菌, 枯草芽孢杆菌和蜡状芽孢杆菌次之, 短小芽孢杆菌最低; N-乙

酰半乳糖胺在蜡状芽孢杆菌、短小芽孢杆菌和炭疽芽孢杆菌细胞中较多, 而在枯草芽孢杆菌和蕈状芽孢杆菌中较少。

细菌全细胞单糖色谱图是细菌化学模式图的一种, 可借助系统聚类分析进行识别^[1]。以表 1 为原始数据, 用欧氏距离系数和最长距离法对 24 株被试菌株作聚类分析, 得到的树状谱如图 7 所示。由图 7 可知, 这些被试菌株可分为 5 群, 基本对应于 5 个菌种。蜡状芽孢杆菌株以标准株

表 1 需氧芽孢杆菌全

Table 1 Cellular monosaccharide compositions

菌株 Strains	1	2	3 (Rib.)	4	5	6	7	8 (Xyl.)	9
<i>B. anthracis</i>									
3-54	2.57	—	3.21	—	—	0.25	3.86	0.90	—
044	2.02	—	5.78	—	—	0.58	3.18	0.58	—
3-15	—	—	4.05	—	—	—	3.04	0.68	—
042	—	—	1.57	—	—	0.87	5.24	1.05	—
3-49	4.90	—	8.16	—	—	0.41	3.27	0.82	—
046	4.97	—	6.35	—	—	0.28	3.04	0.83	—
3-79	2.75	—	4.41	—	—	0.55	2.53	1.10	—
045	—	—	3.68	—	—	0.37	4.41	0.74	—
3-10	3.44	—	3.44	—	—	—	7.23	1.38	—
3-25	3.99	—	6.65	—	—	—	3.72	0.53	—
<i>B. subtilis</i>									
213	—	5.92	3.16	7.10	3.75	8.68	1.58	0.79	3.16
212	5.39	1.80	4.94	0.67	—	4.04	0.22	1.12	8.99
314	1.05	2.64	6.60	5.28	2.37	0.53	1.32	1.32	9.23
312	5.11	—	5.97	6.53	1.99	5.40	0.28	0.57	3.98
221	—	—	3.74	—	2.49	2.24	1.75	2.49	6.73
1.88	—	10.64	2.95	4.09	2.13	2.45	2.95	1.31	9.00
<i>B. cereus</i>									
313	—	—	2.78	—	—	0.37	9.83	1.11	7.42
064	—	—	3.71	—	—	0.50	6.93	2.48	6.93
061	—	4.45	3.74	0.53	—	0.53	6.23	1.42	0.18
065	—	—	3.46	—	—	1.53	5.32	0.80	0.80
071	—	—	2.89	—	—	2.65	3.61	0.72	0.24
1.126	—	—	2.96	—	—	1.78	5.92	0.20	4.54
<i>B. pumilus</i>									
311	—	—	9.58	—	—	0.83	3.33	5.42	1.67
<i>B. mycoides</i>									
411	—	—	4.57	—	—	0.30	10.67	0.61	0.61

注: a. 以百分峰高表示; b. 未测出。 Notes: a. Percentage of Peak Height; b. Undetectable.

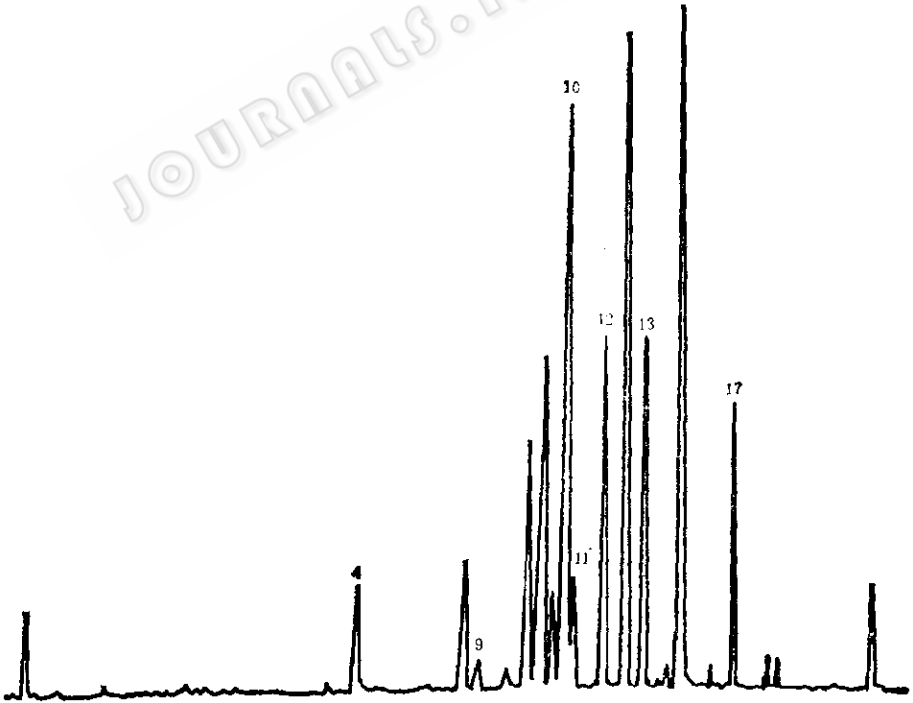


图 2 炭疽芽孢杆菌 3-54 株的细胞单糖气相色谱图

Fig. 2 The GC profile of cellular monosaccharides of *Bacillus anthracis* 3-54

细菌单糖成分表

of aerobic spore-bearing bacilli

10	11	12	13	14 (Man.)	15 (Fru.)	16 (Gal.)	17	18 (Glc.)	19	20	21	22	23	24 (GalNAc)
0.51	7.20	9.64	2.70	17.10	3.21	10.28	19.28	10.28	--	0.64	--	--	--	8.35
0.29	7.23	0.98	2.60	22.25	3.47	11.85	12.14	6.78	--	0.58	--	--	--	10.69
--	7.43	11.82	4.39	28.71	4.39	11.82	9.46	3.04	--	0.34	--	--	--	10.81
0.52	8.39	13.11	3.32	23.25	4.72	10.31	15.73	6.99	--	--	--	--	--	4.90
--	4.90	12.24	2.86	21.22	3.27	9.80	13.06	6.72	--	--	--	--	--	8.98
--	6.63	13.81	3.03	19.89	3.59	11.05	12.43	6.08	--	--	--	--	--	8.01
--	9.36	7.60	2.53	17.07	5.51	12.11	17.07	9.36	--	0.22	--	--	--	7.81
0.74	9.19	13.60	1.84	22.79	3.68	9.19	16.54	6.61	--	0.37	--	--	--	6.25
1.38	9.98	17.21	6.02	23.41	4.64	10.84	4.64	2.93	--	0.86	--	--	--	2.58
0.53	5.85	9.31	1.86	16.48	2.93	7.71	21.28	10.37	--	0.27	--	--	--	8.51
--	4.93	10.06	2.37	13.61	2.37	5.53	13.21	5.33	--	0.20	0.20	0.99	0.99	6.31
0.89	4.94	13.03	3.15	12.36	2.25	5.62	6.97	3.15	--	1.80	1.57	5.39	--	11.69
0.79	1.32	17.15	2.64	3.17	0.26	1.06	17.15	9.50	--	0.53	0.53	3.96	2.37	9.23
0.28	4.26	9.09	1.70	9.66	1.70	4.83	19.03	9.94	--	0.28	0.28	1.70	1.70	5.68
0.50	2.74	17.96	3.49	7.98	0.50	3.24	19.45	7.98	--	0.50	0.50	2.99	2.00	10.72
1.15	1.96	15.55	3.11	4.75	0.65	1.80	16.69	7.36	--	1.15	3.27	0.49	3.27	3.27
1.30	1.11	0.74	11.69	2.41	0.37	0.19	30.61	18.00	--	0.18	0.37	4.08	0.18	7.24
0.25	0.50	0.74	23.51	5.45	3.71	1.24	22.77	9.65	--	--	0.25	2.23	--	9.16
0.53	7.12	13.70	3.91	20.82	3.74	9.79	8.72	4.45	--	--	--	0.89	--	9.25
0.80	9.31	14.10	2.66	26.60	4.26	11.70	7.98	3.46	--	--	--	--	--	7.45
0.24	11.81	13.73	2.89	29.64	6.02	13.01	5.30	3.13	--	--	--	--	--	4.10
0.59	0.39	0.79	24.85	3.35	2.96	1.38	19.13	8.88	--	3.55	4.34	1.97	2.96	9.47
--	15.00	1.67	18.00	2.92	0.83	1.67	6.25	2.08	13.33	1.25	0.42	5.42	1.25	8.75
2.74	5.49	7.01	0.91	14.93	2.44	6.10	28.05	12.20	--	--	--	--	--	3.35

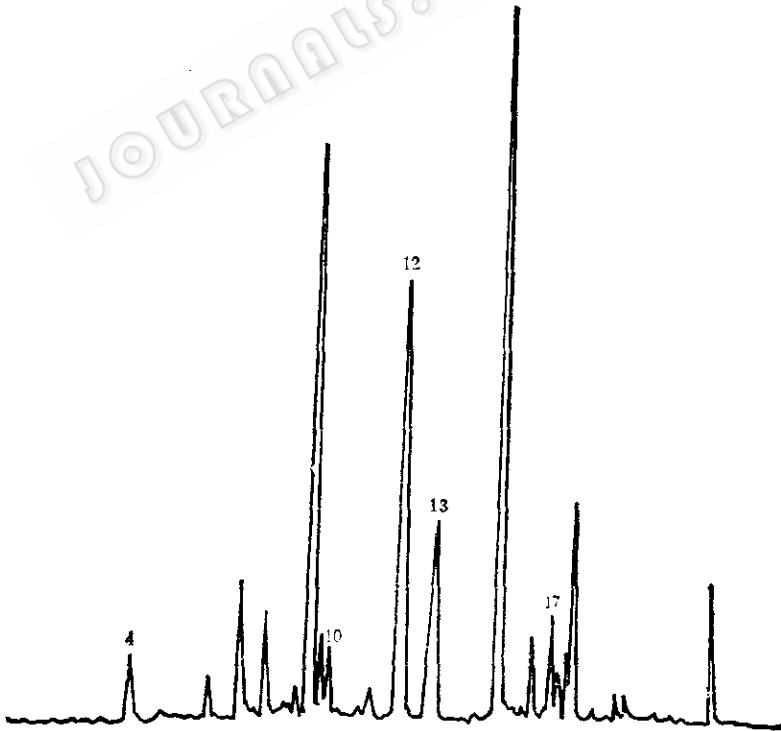


图3 蜡状芽孢杆菌 AS 1.126 株的细胞单糖气相色谱图

Fig. 3 The GC profile of cellular monosaccharides of *Bacillus cereus* AS 1.126

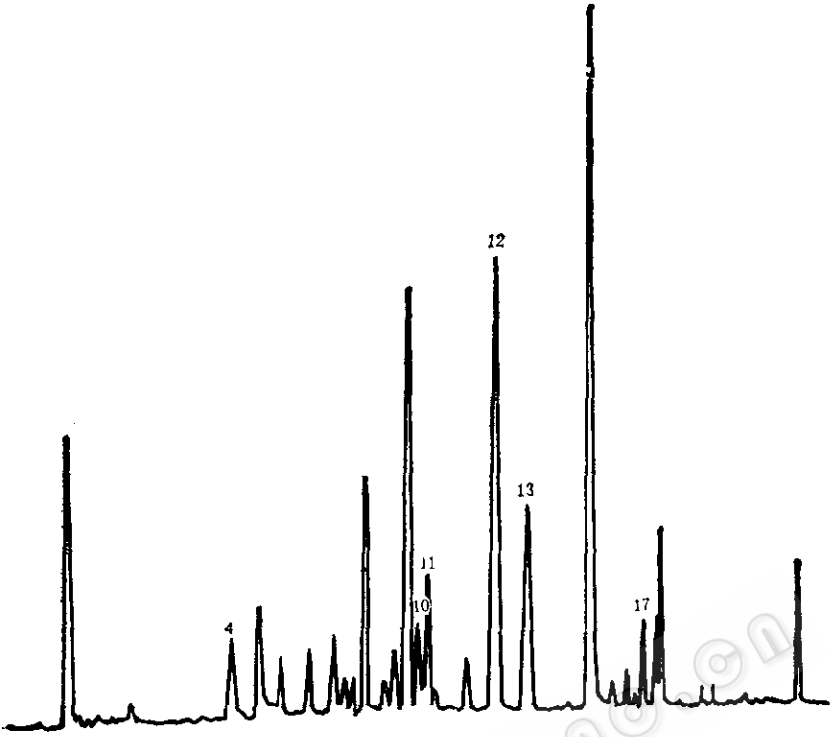


图4 枯草芽孢杆菌 AS 1.88 株的细胞单糖气相色谱图

Fig. 4 The GC profile of cellular monosaccharides of *Bacillus subtilis* AS 1.88

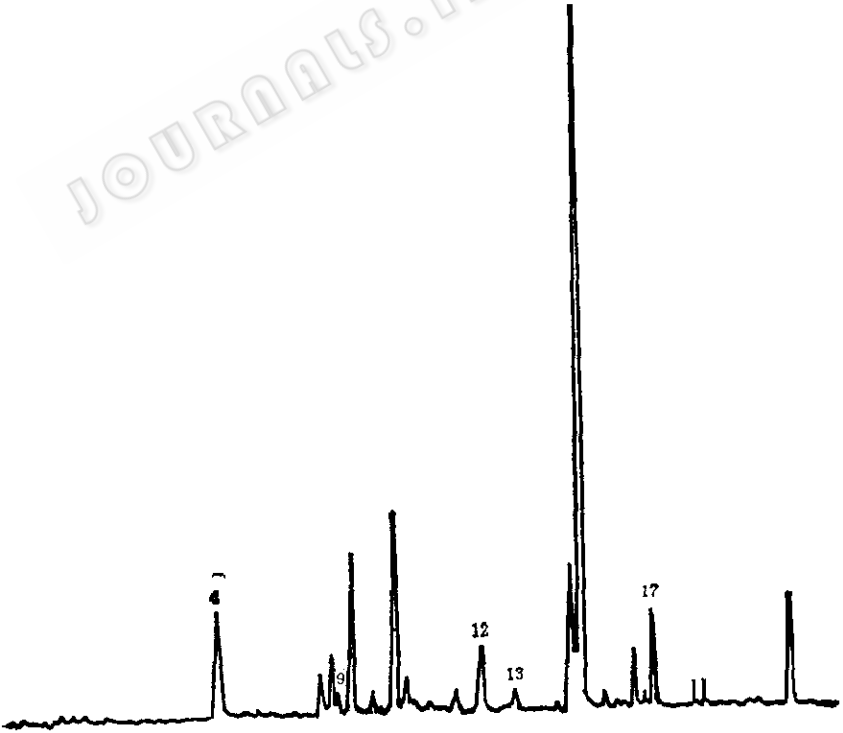


图5 短小芽孢杆菌 311 株的细胞单糖气相色谱图

Fig. 5 The GC profile of cellular monosaccharides of *Bacillus pumilus* 311

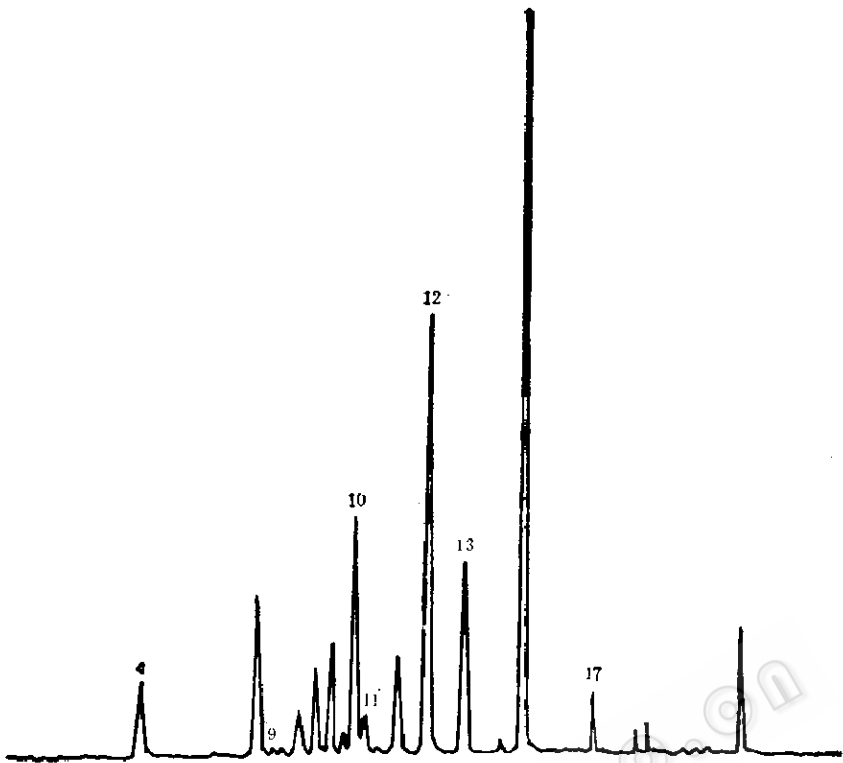


图6 蕈状芽孢杆菌 411 株的细胞单糖气相色谱图

Fig. 6 The GC profile of cellular monosaccharides of *Bacillus mycooides* 411

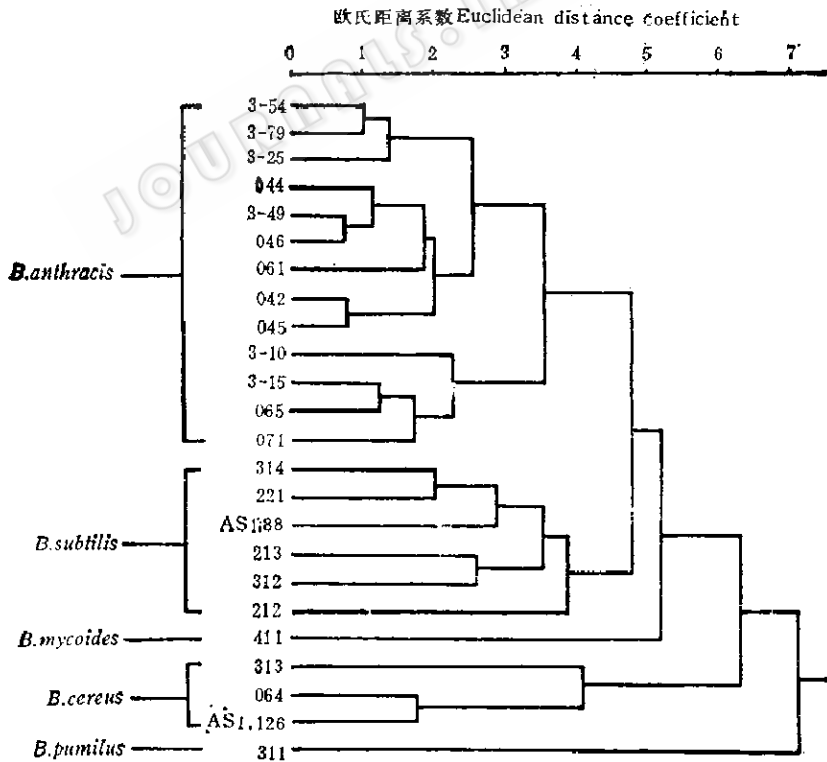


图7 24 株需氧芽孢杆菌细胞单糖组成的聚类树状谱

Fig. 7 The dendrogram of 24 strains of aerobic spore-bearing bacilli based on GC profiles of cellular monosaccharides

AS1.126 为中心聚成一群,但 061、065 和 071 株被聚于炭疽芽孢杆菌的群内。

讨 论

细菌全细胞单糖组成的分析结果有助于进一步阐明被试菌的生物学特性和遗传变异机理。例如炭疽芽孢杆菌,长期以来其分类学位置仍难以确定。一方面,有人根据它和蜡状芽孢杆菌具有 DNA 同源性、共有某些抗原组分以及形态和生化特性上的某些相似之处,建议把它视为蜡状芽孢杆菌的变种。但另一方面,又有人根据它们在形态上不尽相同、病原性和免疫原性有差异以及质粒基因型的不同,认为应把它作为独立的种来看待。本实验的结果似有助于这两种立论的进一步澄清,因为两者的全细胞单糖色谱图有较明显的差别。近年来,我们对本实验室所存炭疽芽孢杆菌株的常规检验、全细胞裂解气相色谱分析和细胞脂肪酸分析的结果都表明,将炭疽芽孢杆菌作为独立的种来看不是没有根据的。但这些实验菌株并非都是典型菌株,有时也确有难以明确区分的例子。例如,在本实验所得的树状谱中,原定名为蜡状芽孢杆菌的 061、065 和 071 株被归入炭疽芽孢杆菌群,它们和标准株 AS1.126 的表型鉴定结果比较,071 株的葡萄糖(+),061 和 065 株的牛奶透明(-),均与 AS1.126 株不同。而 313 株和 AS1.126 株的表型鉴定结果则完全相似,两者聚在同一群内。因此,有人提出把蜡状芽孢杆菌看作炭疽芽孢杆菌的无毒变种^[6],对此值得进一步探讨。菌株 313 和 314 按表型鉴定结果定名为枯草芽孢杆菌,但它们的遗传学鉴定和裂解色谱分析结果却显示出较明

显的差异。本实验结果将这两株菌仍聚于枯草芽孢杆菌群内,这也许说明细胞单糖和表型特征较相近。

随着分子生物学的飞速发展,迫切需要建立微量、高效、简便和灵敏的细胞单糖分析方法。虽然各种单糖的化学结构和构型比较复杂,但现代分析技术的发展已使它们的精细分离和鉴定成为可能,毛细管柱色谱法即是有效的途径之一。本实验通过对 24 株需氧芽孢杆菌全细胞单糖组分的分析,显示出了该法分析生物材料中单糖成分的优越性。首先是该法分离效率高,芽孢杆菌细胞单糖色谱图上可显现包括 7 种已知单糖在内的 20 多个色谱峰,其中一些新的未知成分可供人们进一步研究。其次,该法的样品用量少,在毫克级甚至毫克级以下,这对亚细胞结构和有重要价值的生物医学材料的研究尤为有益。此外,毛细管柱气相色谱仪可与质谱、红外光谱和计算机等联机使用,实现微量样品的分析和化学模式识别。这些是目前常用方法所不具备的。

参 考 文 献

- [1] 程光胜等主编: 分析微生物学专辑, 科学出版社, 北京, 1988。
- [2] 李季伦等编: 微生物学(第二版), 科学出版社, 北京, 1985。
- [3] 戈苏国等: 微生物学报, 23(3): 265-269, 1983。
- [4] 钱世钧等: 微生物学报, 24(4): 335-344, 1984。
- [5] Pritchard, D. G., et al.: *J. Clin. Microbiol.*, 13(1): 89-92, 1981。
- [6] 高树德等: 中国人民解放军军事医学科学院院刊, 10(2): 122-127, 1986。
- [7] 周方等: 科学通报, 29: 1394-1397, 1984。
- [8] 周方等: 微生物学报, 27(2): 95-104, 1987。
- [9] 朱厚础等: 微生物学报, 27(4): 306-317, 1987。

STUDY ON THE DISCRIMINATION OF BACTERIA BY GAS CHROMATOGRAPHIC PROFILES OF CELLULAR MONOSACCHARIDES

Zhou Fang Zhu Houchu Wang Lingchun Gao Shude

(*Institute of Microbiology and Epidemiology, Academy of Military Medical Sciences, P.L.A, Beijing*)

A procedure for obtaining gas chromatographic (GC) profiles of bacterial cellular monosaccharides was described. Some of the unknown component peaks in these profiles were identified. And, based on the complete linkage cluster analysis with the Euclidean distance coefficient, the interpretation of the resulting cellular monosaccharides of bacteria were performed by mini-computer. By means of this method, the discrimination of 5 species (24 strains) of aerobic endospore-forming bacteria. The results showed that there were de-

finer differences between the profiles of cellular monosaccharides of *B. anthracis* and *B. cereus*. This procedure has provided a useful method for the classification and identification of microorganisms, for their physiological and biochemical studies, and for studies on their subcellular components.

Key words

Bacterial cellular monosaccharides; Gas chromatography; Cluster analysis