

气相色谱-质谱法分析肠杆菌细胞脂肪酸

周方 陈立茵

(军事医学科学院微生物学流行病学研究所, 北京)

陈剑鸥

(中国预防医学科学院流行病学研究所, 北京)

朱厚础

(军事医学科学院生物工程研究所, 北京)

用气相色谱-质谱法分析了15种肠杆菌的全细胞酸性水解物,对结果中近30种脂肪酸初步化学定名13种,即 $C_{11:0}$ 、 $C_{12:0}$ 、 $C_{13:0}$ 、 $C_{14:0}$ 、 $C_{15:0}$ 、 $2OH-C_{14:0}$ 、 $3OH-C_{14:0}$ 、 $C_{16:1}$ 、 $C_{16:0}$ 、 $2C_{17:0}$ 、 $\Delta C_{17:0}$ 、 $C_{18:1}$ 和 $D_{18:0}$, 其中含量较高者为 $C_{16:0}$ 、 $C_{18:1}$ 、 $C_{13:0}$ 、 $C_{14:0}$ 、 $C_{15:0}$ 、 $C_{19:0}$ 、 $3OH-C_{14:0}$ 和 $C_{11:0}$ 。肠杆菌细胞脂肪酸成分特征是以直链饱和和不饱和脂肪酸为主, $C_{16:0}$ 含量最高,而且均含有一定量的 $3OH-C_{14:0}$, 沙雷氏菌含 $2OH-C_{14:0}$, 其他未知成分也具有—定特征。本结果为肠杆菌的化学分类学和分子细菌学研究提供了资料。

关键词 肠杆菌;细胞脂肪酸;气相色谱-质谱法

肠杆菌不仅是临床最常见、分类学最复杂、鉴定最困难的一个菌群,而且在生物工程领域中也占有重要位置。深入研究肠杆菌类脂成分化学结构和组成,有助于进一步阐明其分类学地位,也有助于其免疫机理和致病机理的探讨。

自1963年以来,首先由Able等将气相色谱法用于肠杆菌脂肪酸成分分析^[1],而后其他学者继续进行探索研究,并扩展到肠杆菌脂多糖(LPS)化学组分的研究^[2]。1983年Bergan等分析8种肠杆菌脂肪酸成分,并建立了沙雷氏菌的分类模型^[3]。1985年Jantzen等通过对8种肠杆菌脂肪酸的分析,发现十六碳酸和 $3OH-C_{14:0}$ 为特征产物^[4]。我们实验室曾用裂解气相色谱法对64株肠杆菌进行分类研究^[5-8],在此基础上又用气相色谱-质谱法分析肠杆菌细胞酸性水解物,现将结果报告如下。

材料和方法

(一) 菌株

从裂解气相色谱鉴别肠杆菌实验样品中选出19个代表性菌株,除大肠杆菌为临床分离株外,其余均为标准株。大肠杆菌(*Escherichia coli*)临床分离株4330,1221,854,807,弗氏志贺氏菌(*Shigella flexneri*)、宋内氏志贺氏菌(*Shigella sonnei*)、弗氏柠檬酸细菌(*Citrobacter freundii*)、鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*)、甲型副伤寒沙门氏菌(*Salmonella paratyphi A*)、克雷伯肺炎杆菌(*Klebsiella pneumoniae*)、阴沟肠杆菌(*Enterobacter cloacae*)、产气肠杆菌(*Enterobacter aerogenes*)、蜂房哈夫尼菌(*Hafnia alvei*)、粘

质沙雷氏菌 (*Serratia marcescens*), 普通变形菌 (*Proteus vulgaris*), 奇异变形菌 (*Proteus mirabilis*), 摩氏变形菌 (*Proteus morganii*), 雷氏变形菌 (*Proteus rettgeri*) 等 15 种。

(二) 菌种培养及样品制备

详见参考文献 [5, 6]。

(三) 细菌样品水解及脂肪酸甲酯化

精确称量干燥菌粉 5mg, 放入带螺帽水解管内, 加 2mol/L 氯化氢甲醇液 2ml, 充氮气密封, 100°C 水浴 40min 或 95°C 4h 水解。冷却至室温用氮气吹至原体积的一半, 用 2ml 己烷分两次提取, 合并己烷提取液用氮气吹干, 加 200 μ l 己烷溶解残留物供气相色谱和气相色谱-质谱法分析。

(四) 气相色谱分析

美国 Perkin-Elmer SIGMA 115 型气相色谱系统, 双氢焰鉴定器。美国 Hewlett-Pakard 12m 交联甲基硅酮石英玻璃高效毛细管色谱柱。载气 (高纯氮) 2ml/min, 分流比 20:1, 高纯氢气 30 ml/min, 空气 300ml/min。柱温 80°C—(4°C/min)—250°C, 延迟 25min。

(五) 气相色谱-质谱分析

美国 HP5890A GC-5970B MS-5970C Station。电子轰击 eV 4V, 15m 石英玻璃毛细管柱, 壁涂 OV-1。

结果和讨论

图 1 为标准脂肪酸色谱图。每种肠杆

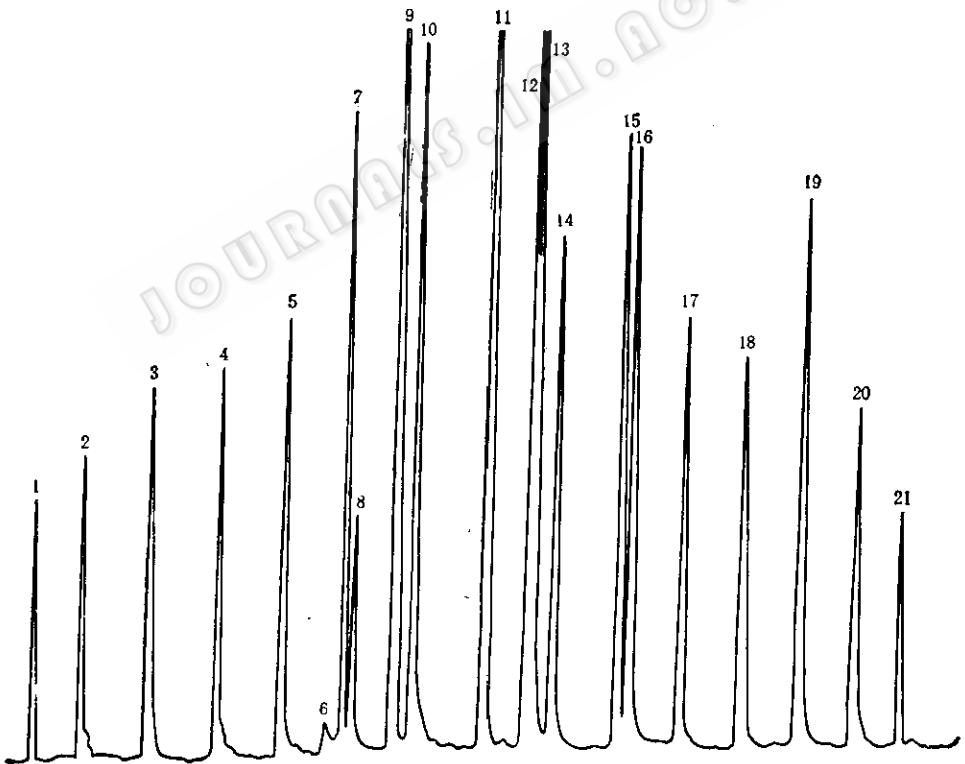


图 1 标准脂肪酸色谱图

Fig.1 Standard fatty acids chromatogram

1. $C_{10:0}$; 2. $C_{11:0}$; 3. $C_{12:0}$; 4. $C_{13:0}$; 5. $C_{14:0}$; 6. $12OH-C_{12:0}$; 7. $C_{15:0}$; 8. $2OH-C_{14:0}$; 9. $C_{16:1}$; 10. $C_{16:0}$; 11. $C_{17:0}$; 12. $C_{18:2}$; 13. $C_{18:1}$; 14. $C_{18:0}$; 15. $C_{19:0}$; 16. $C_{20:4}$; 17. $C_{20:0}$; 18. $C_{21:0}$; 19. $C_{22:0}$; 20. $C_{23:0}$; 21. $C_{24:0}$; 22. $3OH-C_{14:0}$; 23. $2C_{17:0}$; 24. $\Delta C_{17:0}$

菌都能得到含有多种脂肪酸成分的气相色谱图。图 2—6 分别为弗氏志贺氏菌、鼠伤寒沙门氏菌、产气肠杆菌、粘质沙雷氏菌和普通变形菌的细胞脂肪酸色谱图。首先以棕榈酸为内标物，用其保留时间去去除其他各个成分的保留时间 $RT_x/RT_{C_{16:0}}$ ，得到一系列相对保留值，按相同相对保留值的位置定出各种成分。表 1 是在 $C_{11:0}$ — $C_{20:0}$ 范围内相对保留值对实验菌株各种脂肪酸百分含量表。表 1 中每一行至少有一个值大于 1%，个别含量高的未知成分未列入表内，但也作为特征产物。

按下述方法对表 1 中组分进行化学定名。首先用标准试剂的标准色谱图和共色谱法，参照 Moss 标准试剂图定名，最后用气相色谱-质谱法分别核对上述定性结果，

将确认的成分列于表 1。表 1 中 27 种成分有 13 种被确认，它们是十一烷酸 ($C_{11:0}$)、十二烷酸 ($C_{12:0}$)、十三烷酸 ($C_{13:0}$)、十四烷酸 ($C_{14:0}$)、十五烷酸 ($C_{15:0}$)、2 羟基-十四烷酸 ($2OH-C_{14:0}$)、3 羟基-十四烷酸 ($3OH-C_{14:0}$)、棕榈油酸 ($C_{16:1}$)、棕榈酸 ($C_{16:0}$)、异十七烷酸 ($aC_{17:0}$)、9,10 甲叉-十六烷酸 ($\Delta C_{17:0}$)、油酸 ($C_{18:1}$)、和硬脂酸 ($C_{18:0}$)。按含量由高至低依次为 $C_{16:0}$ 、 $C_{18:1}$ 、 $C_{15:0}$ 、 $C_{14:0}$ 、 $C_{16:1}$ 、 $3OH-C_{14:0}$ 、 $C_{13:0}$ 和 $C_{13:0}$ 等。由此得知，肠杆菌细胞脂肪酸含量最高者是 $C_{16:0}$ ，另外均含有 3—8% $3OH-C_{14:0}$ 。除此之外，沙雷氏菌还含有 2—3% $2OH-C_{14:0}$ ；摩氏变形菌 $C_{16:0}$ 含量高达 40%，而且缺少 $aC_{17:0}$ 和 $\Delta C_{17:0}$ ；产气肠杆菌和克雷伯氏菌缺少 $aC_{17:0}$ ；沙门氏

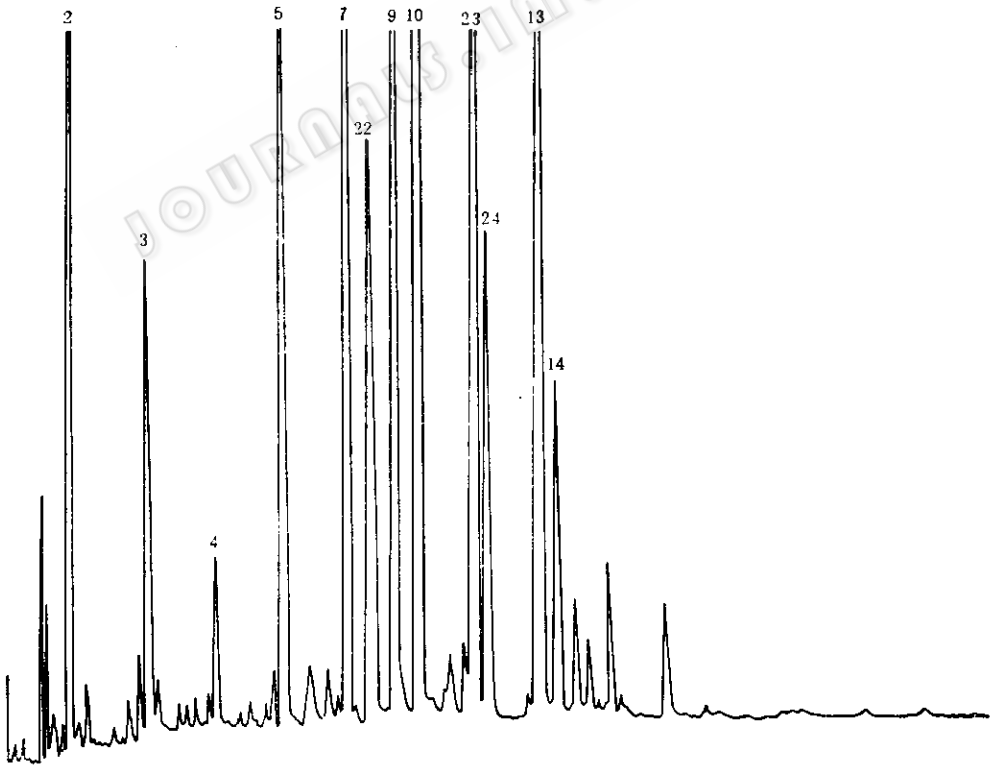


图 2 弗氏志贺氏菌细胞脂肪酸色谱图

Fig.2 Fatty acid chromatogram of *Shigella flexneri*.

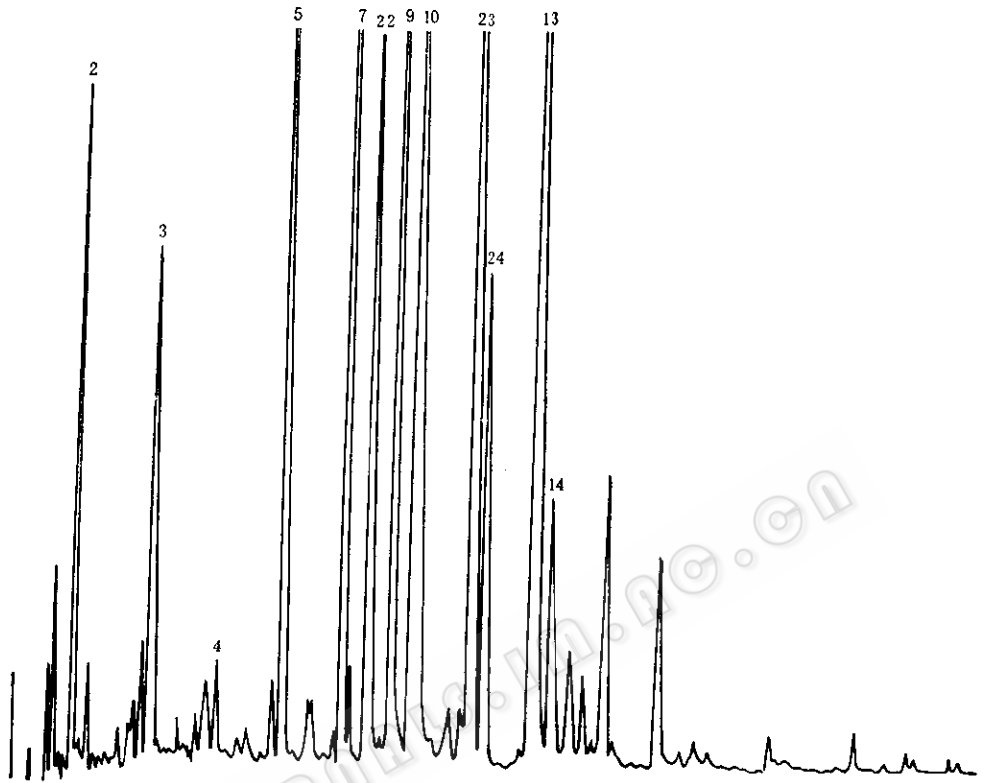


图 3 鼠伤寒沙门氏菌细胞脂肪酸色谱图

Fig.3 Fatty acid chromatogram of *Salmonella typhimurium*

菌、志贺氏菌、阴沟肠杆菌和雷氏变形菌含 $C_{11:0}$ 在 2.5% 以上, 摩氏变形菌和奇异变形菌含 $C_{14:0}$ 低于 4%; 奇异变形菌 $C_{19:1}$ 低于 4%, 而其他菌均高于 6%。

含量在 1% 以上, 尚未确认化学名称的成分有如下几种, 宋内氏志贺氏菌在相对保留值 0.5732 处有一未知特征产物; 摩氏变形菌、哈夫尼菌、产气肠杆菌、克雷伯菌、柠檬酸菌为 0.5782; 宋内氏志贺氏菌、大肠杆菌、克雷伯菌、柠檬酸菌和沙雷氏菌为 0.7934; 摩氏变形菌和产气杆菌为 0.8035; 克雷伯菌为 0.8017; 摩氏变形菌、宋内氏志贺氏菌、产气肠杆菌和克雷伯菌为 0.8977; 产气肠杆菌、克雷伯菌、柠檬酸

酸、宋内氏志贺氏菌、奇异变形菌和大肠杆菌为 0.9859; 产气肠杆菌、克雷伯菌、柠檬酸菌和摩氏变形菌为 1.0733。以上各未知成分基本上都得到了质荷比, 其化学名称有待进一步确认。

实验结果表明, 肠杆菌作为革兰氏阴性菌的一个重要组成部分, 其脂肪酸含量比较丰富。其中许多成分是共有的, 只有含量多少的区别, 而且都含有特征性的 $3OH-C_{14:0}$ 。结果中也有某些规律性的特征, 如沙雷氏菌的 $2OH-C_{14:0}$, 一些未知成分有可能成为某些菌的特征组分。相对而言, 肠杆菌属和变形菌属细胞脂肪酸组成规律性较差, 这可能和目前肠杆菌分类

表1 肠杆菌属脂肪酸成分表

Table 1 Fatty acid compositions of Enterobacteriaceae

RT _(x) /RT _(C_{14:0})	Serratia marcescens		Hafnia alvei	Enterobacter aerogenes	Enterobacter cloacae	Klebsiella pneumoniae	Citrobacter freundii	Salmonella typhimurium	Salmonella paratyphi A
	1	2							
0.4835(C _{11:0})	0.7546	0.1766	0.8169	1.1959	3.5824	0.4810	1.3423	3.7664	10.2592
0.5732	—	—	—	—	—	—	—	0.7693	—
0.5782	—	—	1.7187	3.7319	—	1.9408	2.5120	—	—
0.5885	1.0108	1.7126	1.0031	—	0.5579	—	1.5307	0.7620	1.0515
0.6005(C _{17:0})	0.9590	0.6338	2.9462	1.9071	1.5463	1.3480	2.4330	3.2676	2.7695
0.7020	0.2007	—	—	—	0.3029	2.8650	2.5828	—	—
0.7057(C _{15:0})	1.8779	2.5243	0.8244	4.0459	0.8707	2.0359	1.0113	0.9213	1.2857
0.7934	2.1261	2.4715	0.9589	—	0.3465	4.3594	3.6240	0.5447	0.5324
0.8035	—	—	—	3.9985	—	—	—	—	—
0.8085(C _{14:0})	6.8905	5.9629	6.6799	6.0828	7.3345	6.2826	6.2532	4.4465	4.9732
0.8617	—	—	—	—	—	4.3523	—	—	—
0.8709	—	—	—	9.1329	—	—	—	—	—
0.8977	—	—	—	2.1272	—	2.7346	—	—	—
0.9022(C _{19:0})	2.5980	2.8923	5.8945	6.6131	7.5976	10.1880	6.8921	4.0201	4.0116
0.9104(2OH-C _{14:0})	2.5763	3.5173	—	—	—	—	—	0.9747	0.6927
0.9392(3OH-C _{14:0})	6.3705	8.5237	4.9238	3.3285	6.3103	6.4561	5.8614	4.8074	3.8921
0.9712(C _{16:1})	1.5421	7.0282	6.4813	4.1443	11.9162	3.5128	8.5540	5.8485	8.5392
0.9859	0.9236	—	—	1.4575	—	2.0533	1.3863	—	—
1.0000(C _{16:0})	31.8865	30.6531	28.7201	14.5972	24.4138	19.9829	19.1222	25.5346	22.1165
1.0043	—	—	—	—	—	—	—	—	—
1.0665(aC _{17:0})	8.9871	3.7306	9.6127	—	2.7375	—	0.4595	6.5324	4.0480
1.0733	—	—	—	4.6464	—	6.4295	5.2222	—	—
1.0834(ΔC _{17:0})	2.7480	2.6553	1.4636	4.2937	4.7825	3.4682	2.0338	3.0080	1.5361
1.1475(C _{16:1})	10.7427	10.8637	9.5630	6.9444	15.1374	7.0759	9.3713	14.7230	9.0907
1.1579	—	—	—	—	—	—	—	—	—
1.1685(C _{18:0})	3.0290	3.4772	1.7060	1.3080	2.1251	1.8177	1.4362	2.2853	2.5607
1.2416	—	—	—	1.0752	—	0.5016	0.1885	—	0.5783

表 1 (续)

RT _(x) /RT _(C_{11:0})	<i>Escherichia coli</i>				<i>Proteus rettgeri</i>	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Proteus morgani</i>	<i>Proteus vulgaris</i>	<i>Shigella flexneri</i>	<i>Shigella sonnei</i>
	1221	4330	807	854						
0.4836(C _{11:0})	0.7818	1.4943	1.1990	0.6429	3.0979	0.1527	1.4246	2.2907	4.1782	2.7839
0.5732	—	—	—	—	—	0.3481	—	—	—	6.0007
0.5782	1.9061	5.9068	0.4690	3.1997	—	—	1.3641	—	—	—
0.5885	1.0233	2.1740	1.0738	1.4491	0.9248	0.1832	—	0.2466	0.4368	2.6791
0.6005(C _{13:0})	1.8182	2.0255	2.7501	2.5023	0.5078	0.1420	1.6681	2.1415	3.0026	1.9678
0.7020	1.7995	3.0241	—	2.3758	0.4755	—	—	0.1883	0.3398	3.7028
0.7057(C _{13:0})	0.3517	1.3881	1.5505	1.4265	0.4240	0.1642	4.3281	2.6619	1.5296	1.1277
0.7934	1.0684	2.9285	1.3727	3.3083	0.5610	0.9444	—	0.2623	0.3567	4.1713
0.8035	—	—	—	—	—	—	2.9127	—	—	—
0.8085(C _{11:0})	3.5483	5.1308	6.7222	6.3195	8.4469	3.3858	3.7375	7.3145	7.1361	5.4571
0.8617	0.2508	0.4185	—	0.5761	—	0.3075	—	—	—	—
0.8709	—	—	1.1606	—	—	—	—	—	—	—
0.8977	—	—	—	—	—	—	2.4629	—	—	2.3243
0.9022(C _{13:0})	2.5932	3.5077	3.9383	7.5836	6.6034	1.9615	1.6603	14.5674	9.3765	7.8343
0.9104(2OH-C _{11:0})	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
0.9392(3OH-C _{11:0})	3.4217	5.3912	4.2880	4.9900	4.3085	3.0339	3.1850	4.4443	4.5335	4.4126
0.9712(C _{16:1})	2.6768	3.4728	4.3977	5.5727	4.9374	1.6441	5.2517	10.3252	5.9198	7.2065
0.9859	1.8418	1.0729	—	1.0539	—	1.4159	—	—	—	1.6565
1.0000(C _{16:0})	14.3574	18.7858	30.5470	21.5417	32.5560	8.9524	40.8835	24.4150	26.7138	14.4871
1.0043	8.5687	—	—	—	—	26.2296	—	—	—	—
1.0665(aC _{17:0})	3.4558	1.1893	7.0372	5.5226	5.0119	1.2253	—	5.0272	6.5631	3.5480
1.0733	1.5237	0.5350	—	—	—	0.9513	9.6388	—	—	—
1.0834(ΔC _{17:0})	1.9533	1.7240	2.6957	3.6017	3.7708	1.3365	—	2.5252	2.9792	2.8673
1.1475(C _{18:1})	6.2196	7.5247	12.7238	6.9208	11.2111	3.7643	9.7618	10.0474	10.9198	8.0505
1.1579	1.2429	0.3588	—	—	—	0.7307	—	—	—	—
1.1686(C _{18:0})	2.2363	2.0582	4.4538	0.5629	5.5622	1.6011	6.0196	2.2095	2.4315	2.6971
1.2416	—	0.4767	2.6927	—	1.9588	0.9383	2.3746	—	—	—

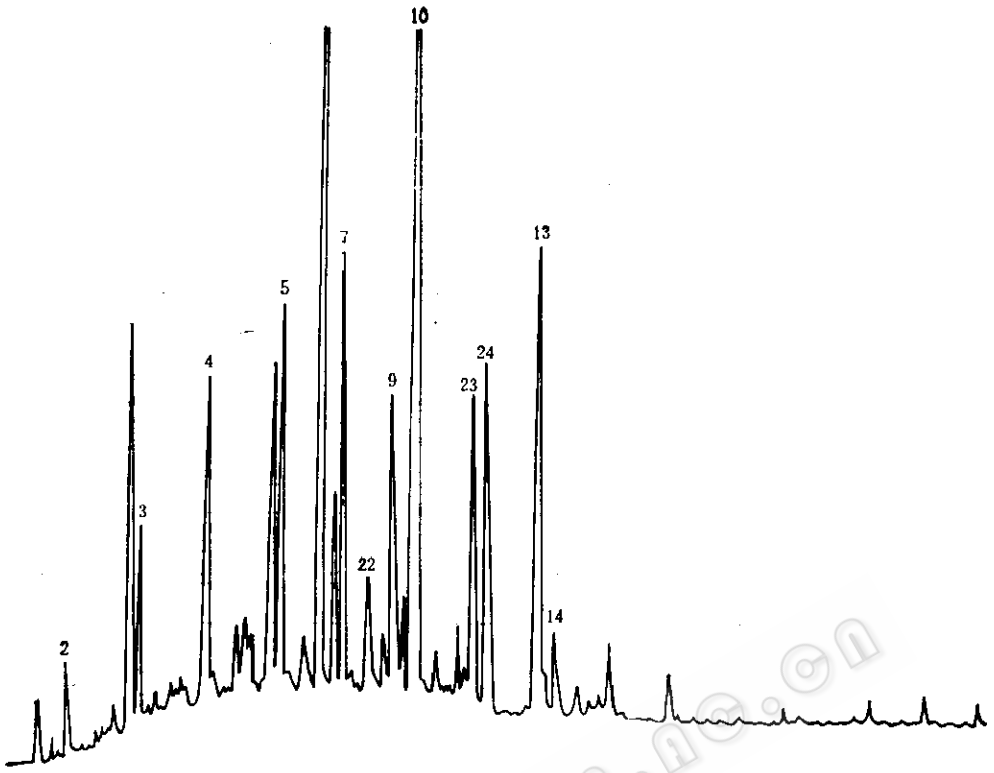


图4 产气肠杆菌细胞脂肪酸色谱图
Fig.4 Fatty acid chromatogram of *Enterobacter aerogenes*

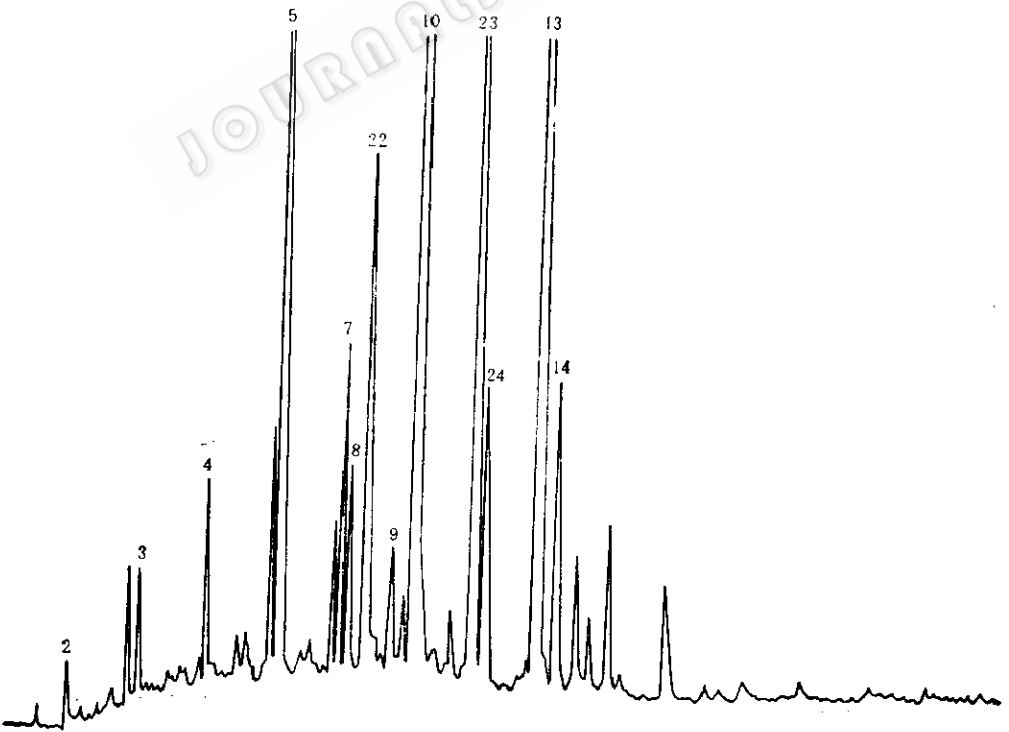


图5 粘质沙雷氏菌细胞脂肪酸色谱图
Fig.5 Fatty acid chromatogram of *Serratia marcescens*

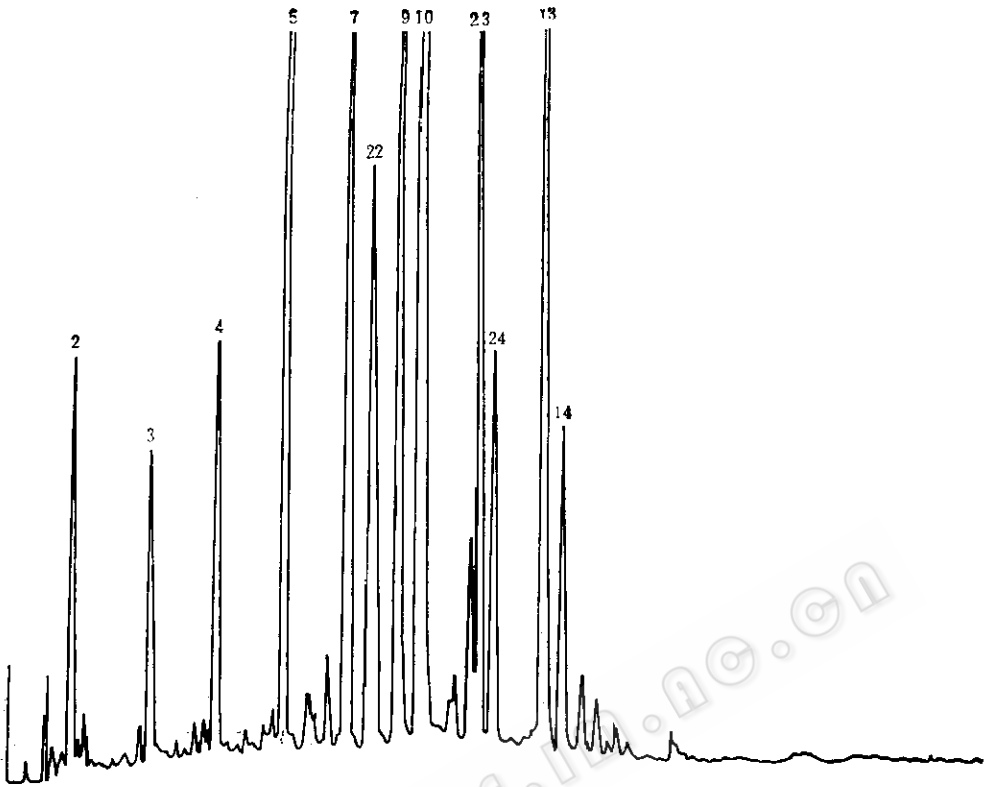


图 6 普通变形菌细胞脂肪酸色谱图

Fig.5 Fatty acid chromatogram of *Proteus vulgaris*

学上的分歧意见是一致的。

本实验结果不仅为肠杆菌的化学分类提供了数据,而且也为分子细菌学的研究提供了资料。

参 考 文 献

- [1] Able, K. et al.: *J. Bacteriol.* 85:1039—44, 1963.
- [2] 程光胜等主编: 分析微生物学专辑、科学出版社,北京,1988。
- [3] Bergan, T. et al.: *Current Microbiology.* 8(1):7—11,1983.
- [4] Jantzen, E. et al.: *Chemical Methods in Bacterial Systematics* (ed. by Goodfellow, M. and D.E. Minnikin), Academic Press, London, pp.145—171,1985.
- [5] 金天如等: 中国医学科学院学报, 6(1): 39, 1984。
- [6] ——: 科学通报,(2): 148,1985。
- [7] ——: 中华微生物学和免疫学杂志, 4(3): 117, 1984。
- [8] ——: 微生物学报, 25(1): 13—18,1985。

ANALYSIS OF CELLULAR FATTY ACIDS OF ENTEROBACTERIA SPECIES BY GAS CHRO- MATOGRAPHY-MASS SPECTROMETRY

Zhou Fang Chen Liyin

(*Institute of Microbiology and Epidemiology, Beijing*)

Chen Jianou

(*Institute of Epidemiology and Microbiology, Chinese
Academy of Preventive Medicine, Beijing*)

Zhu Houchu

(*Institute of Biotechnology, Beijing*)

Cellular fatty acid compositions of 15 Enterobacteria were analyzed by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). About 30 fatty acids were detected in chromatograms, and 13 of them were chemically identified, e.i. $C_{11:0}$, $C_{12:0}$, $C_{13:0}$, $C_{14:0}$, $C_{15:0}$, $2OH-C_{14:0}$, $3OH-C_{14:0}$, $C_{16:1}$, $C_{16:0}$, $\alpha C_{17:0}$, $\Delta C_{17:0}$, $C_{18:1}$ and $C_{18:0}$. The major cellular fatty acids in all fifteen species were $C_{16:0}$, $C_{18:1}$, $C_{15:0}$, $C_{14:0}$, $C_{16:1}$, $C_{13:0}$, $3OH-C_{14:0}$ and $C_{18:0}$. The cellular fatty acids of Enterobacteria species were characterized by normal straight-chain saturated acids and monounsaturated acids, of which the most abundant fatty acid

was $C_{16:0}$. $3OH-C_{14:0}$ was found in all strains of Enterobacteria, whereas $2OH-C_{14:0}$ was only found in strains of Serratia species. Other unknown compositions also would have been certain characteristics for bacteria. The present paper would provide some of useful reference data for chemotaxonomy and molecular microbiology of Enterobacteria.

Key words

Enterobacteria; Cellular fatty acids;
Gas chromatography-mass spectrometry