

# 立克次体脂肪酸图谱及其相似性判别\*

周方 胥照平 陈立茵 朱厚础 陈香蕊 汪民

(军事医学科学院微生物流行病学研究所,北京)

用气相色谱-质谱法分析了7株立克次体浓盐乙醚纯化物的脂肪酸成分,即 *R. prowazekii* E株、*R. conorii* Simko株、*R. rickettsii* R株、*R. sibirica* Barbash株和246株、*R. sinkiangensis* Jinghe株以及 *R. heilungkiangensis* 54株。所得脂肪酸色谱图中有近50个色谱峰,初步确认有以下16种:  $C_{11:0}$ 、 $2OH-C_{10:0}$ 、 $C_{11:0}$ 、 $2OH-C_{12:0}$ 、 $C_{13:0}$ 、 $C_{14:0}$ 、 $C_{15:0}$ 、 $3OH-C_{14:0}$ 、 $C_{16:1}$ 、 $C_{16:0}$ 、 $C_{17:0}$ 、 $C_{18:1}$ 、 $C_{18:2}$ 、 $C_{18:0}$ 、 $C_{19:0}$ 和 $C_{22:0}$ 。其中主要成分是直链饱和脂肪酸  $C_{16:0}$ 、 $C_{18:0}$ 及 $C_{14:0}$ 与不饱和脂肪酸  $C_{18:1}$ 、 $C_{18:2}$ 及 $C_{16:1}$ 。

实验菌株脂肪酸图谱经改进的Kulik-Vincent相似系数法处理后,精河株和246株的相似系数为97.0%,54株和其他菌株的相似系数在81.6—94.6%之间。

**关键词** 立克次体;脂肪酸图谱;相似性

类脂成分在分子立克次体学研究中占有重要位置<sup>[1,2]</sup>。自1946年Tovarnickij等报告普氏立克次体磷脂成分以来<sup>[3]</sup>,由于纯化和分析方法的限制,该项工作进展缓慢<sup>[4]</sup>,远远落后于分子细菌学<sup>[5]</sup>。直到1978年才由Winkler和Miller报告了普氏立克次体脂肪酸气相色谱分析<sup>[6]</sup>,但尚未涉及到不同的种和群。1981年Moss等分析了斑点热、斑疹伤寒和Q热3群6株立克次体,发现了Q热立克次体和其他毒株脂肪酸成分的明显区别<sup>[7]</sup>。我们对斑点热和斑疹伤寒群的5个参考株和我国新分离的2个分离株的脂肪酸成分进行分析,为其生物学特性的解释以及化学分类关系提供了有益的参考数据。

## 材料和方法

### (一) 实验毒株

实验毒株为普氏立克次体 (*Rickettsia prowazekii*) E株,立氏立克次体 (*R. rickettsii*) R株,西伯利亚立克次体 (*R. sibirica*) Barbash株和246株,康氏立克次

体 (*R. conorii*) Simko株,我国新分离新疆立克次体 (*R. sinkiangensis*) Jinghe株,黑龙江立克次体 (*R. heilungkiangensis*) 54株,详细来源见文献[8]。

### (二) 立克次体分离纯化方法

均采用鸡胚卵黄囊培养物,浓盐乙醚法纯化,详细方法见文献[9]。

### (三) 立克次体纯化物水解及甲酯化

取立克次体纯化物,一般相当10个鸡胚卵黄膜提取物的混悬液,用氮气吹干,加入2 ml 2 mol/L HCl-CH<sub>3</sub>OH水解液,通氮气密封,95℃ 6h,放置室温后用氮气吹至原体积的一半。用2 ml 己烷分两次提取,合并提取液,氮气吹干后立即用0.2 ml 己烷溶解,供气相色谱和气相色谱-质谱分析。

### (四) 气相色谱分析

用美国Perkin-Elmer SIGMA 115 Gas Chromatographic System配Hewlett-Packard 12m 甲基硅酮毛细管色谱柱和

本文于1990年2月20日收到。

\* 国家自然科学基金资助的课题

双氢焰电离鉴定器。柱温 80℃—(4℃/min)—250℃, 气化室和鉴定器 270℃, 载气(高纯氮) 2 ml/min, 分流比为 1:10。脂肪酸甲酯标准试剂为 SIGMA 试剂。

(五) 气相色谱-质谱分析

美国 Hewlett-Packard 5890 A GC/5790B MS/5970C Station 联用系统, OV-1 毛细管柱, eV 4V。

(六) 相似性计算法

判别各毒株间的亲疏关系采用 Kulik-Vincent 相似系数法 (KV<sub>i</sub>)<sup>[10]</sup>, 即:

$$KV_i = \frac{N_i}{N_i + N_d}$$

式中 N<sub>i</sub> 为两个毒株色谱图中共有峰的数目, N<sub>d</sub> 为二者分别特有峰的数目。

上式仅根据色谱图中色谱峰的存在与否来判别, 忽略了定量差异。改进的 KV<sub>i</sub> 则依据共有和特有峰的面积来判别, 即

$$KV'_i = \frac{A(N_i)}{A(N_i) + A(N_d)}$$

式中 A(N<sub>i</sub>) 为两个毒株色谱图中共有峰百分面积和, A(N<sub>d</sub>) 为二者分别特有峰的百分面积和。

结 果

图 1—8 为标准脂肪酸 (C<sub>10:0</sub>—C<sub>24:0</sub>) 和实验毒株的细胞脂肪酸色谱图, 有近 50 个峰。经共色谱和质谱法初步确认 16 种脂肪酸, 即: 二十二烷酸(山萘酸 C<sub>22:0</sub>)、十九烷酸 (C<sub>19:0</sub>)、十八烷酸(硬脂酸 C<sub>18:0</sub>)、油酸(C<sub>18:1</sub>)、亚油酸 (C<sub>18:2</sub>)、十七烷酸(珠光脂酸 C<sub>17:0</sub>)、十六烷酸(棕榈酸 C<sub>16:0</sub>)、棕榈油酸 (C<sub>16:1</sub>)、3 羟基-十四烷酸 (3OH-C<sub>14:0</sub>)、十五烷酸 (C<sub>15:0</sub>)、十四烷酸 (C<sub>14:0</sub> 肉豆蔻酸)、2 羟基-十二烷酸(2OH-C<sub>12:0</sub>)、十三烷酸 (C<sub>13:0</sub>)、十二烷酸(月桂酸 C<sub>12:0</sub>)、2 羟基-十烷酸 (2OH-C<sub>10:0</sub>) 和十一烷酸

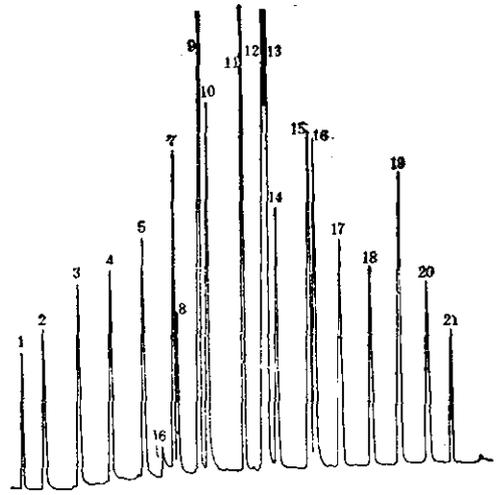


图 1 标准脂肪酸色谱图

Fig. 1 The chromatogram of standard fatty acids

- 1. C<sub>10:0</sub>; 2. C<sub>11:0</sub>; 3. C<sub>12:0</sub>; 4. C<sub>13:0</sub> 5. C<sub>14:0</sub>; 6. 12OH-C<sub>12:0</sub>; 7. C<sub>15:0</sub>; 8. 2OH-C<sub>14:0</sub>; 9. C<sub>16:1</sub>; 10. C<sub>16:0</sub>; 11. C<sub>17:0</sub>; 12. C<sub>18:2</sub>; 13. C<sub>18:1</sub>; 14. C<sub>18:0</sub>; 15. C<sub>19:0</sub>; 16. C<sub>20:0</sub>; 17. C<sub>20:1</sub>; 18. C<sub>21:0</sub>; 19. C<sub>22:0</sub>; 20. C<sub>23:0</sub>; 21. C<sub>24:0</sub>; 22. 2OH-C<sub>10:0</sub>; 23. 2OH-C<sub>12:0</sub>; 24. 3OH-C<sub>16:0</sub>

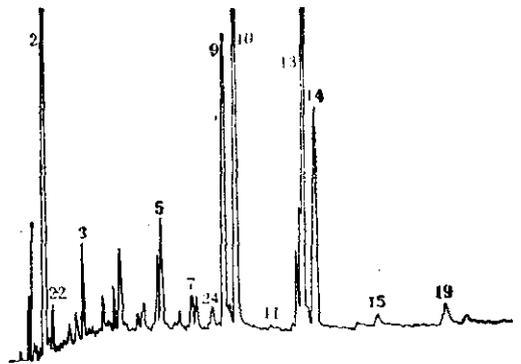


图 2 普氏立克次体 E 株的脂肪酸色谱图

Fig. 2 The chromatogram of fatty acids of *R. prowazekii* E

(C<sub>11:0</sub>) 等。其中主要成分是直链饱和脂肪酸: 棕榈酸、硬脂酸和肉豆蔻酸, 以及直链不饱和和烯酸: 油酸、亚油酸和棕榈油酸。

表 1 为实验毒株脂肪酸百分含量表, 其中 Rt<sub>x</sub> 为每种成分的保留时间, Rt<sub>C<sub>16:0</sub></sub> 为棕榈酸的保留时间, 所列比值为相对保

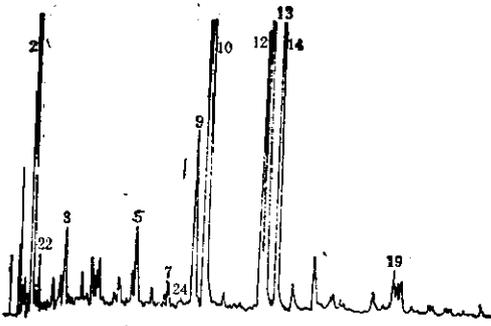


图 3 康氏立克次体 Simko 株的脂肪酸色谱图  
Fig. 3 The chromatogram of fatty acids of  
*R. conorii* Simko

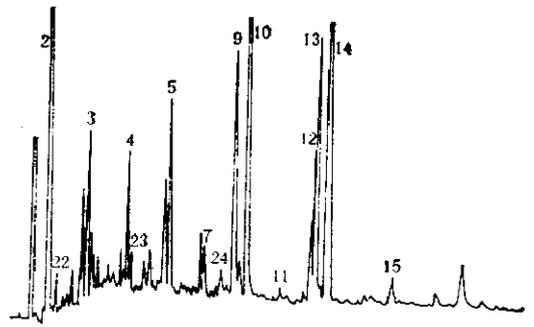


图 6 立氏立克次体 R 株的脂肪酸色谱图  
Fig. 6 The chromatogram of fatty acids of  
*R. rickettsii* R

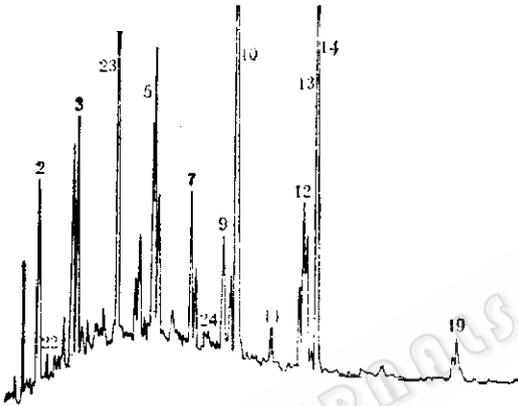


图 4 西伯利亚立克次体 Barbash 株的脂肪酸  
色谱图  
Fig. 4 The chromatogram of fatty acids of  
*R. sibirica* Barbash

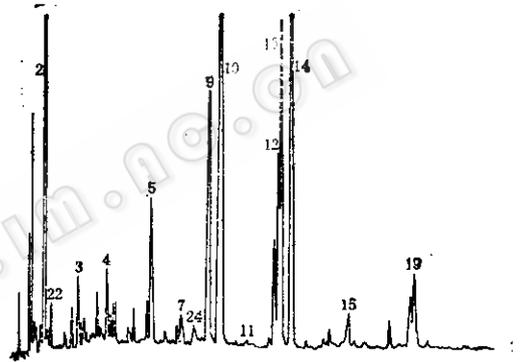


图 7 新疆立克次体精河株的脂肪酸色谱图  
Fig. 7 The chromatogram of fatty acids  
of *R. sinxiangensis* Jinghe

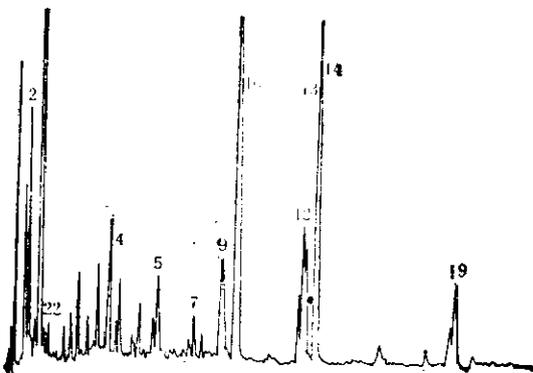


图 5 西伯利亚立克次体 246 株的脂肪酸色谱图  
Fig. 5 The chromatogram of fatty acids of  
*R. sibirica* 246

留值, 已知成分用括号标出, 其余为尚未定名成分。就已知成分而言, Simko 株和 E 株缺少  $C_{13:0}$  和  $2OH-C_{12:0}$ , 而前者又缺少  $C_{16:1}$ , E 株缺少  $C_{18:2}$ ; R 株和 54 株同时存在  $C_{13:0}$  和  $2OH-C_{12:0}$ , 但 R 株又缺少  $C_{22:0}$ ; Barbash 株缺少  $C_{13:0}$ , 而 246 株和精河株缺少  $2OH-C_{12:0}$ , 初步显示出彼此间的某些差异。

根据各毒株色谱图中所有成分的定性定量结果判别彼此间的相似性。用  $KV'$  计算结果是: 所有毒株彼此相似系数均在 64—84% 之间, 5 个参考株是在 67—80%, 54 株和 Barbash 株  $KV'$  为 82%, 精河

表 1 立克次体脂肪酸成分  
Table 1 Fatty acid compositions of the *Rickettsia*

$R_{T_2}/R_{C_{16:0}}$	<i>R. conori</i> Simko	<i>R. sibirica</i> Barbash	<i>R. sibirica</i> 246	<i>R. sinhian-</i> <i>gensis</i> Jinghe	54	<i>R. rickettsii</i> R	<i>R. prowazekii</i> E
0.497(C <sub>11:0</sub> )	10.9908	2.8476	21.3006	12.5189	12.8494	9.2357	11.5917
0.507(2OH-C <sub>10:0</sub> )	0.9633	0.3219	0.7286	1.0068	1.0938	1.0322	1.7305
0.529	0.3126	0.5658	0.3728	0.3075	1.4698	1.2452	0.4972
0.554	0.7019	1.0428	0.8229	0.6025	2.0026	1.8103	1.2701
0.571	0.4735	—	1.0677	1.0299	1.4412	1.0549	1.8505
0.578	0.5259	3.5707	—	—	1.0809	2.1518	—
0.591	1.2213	3.2951	1.5521	1.2212	3.4207	3.5413	2.5346
0.604(C <sub>12:0</sub> )	0.3775	1.4542	0.6552	0.8568	1.7251	2.3842	1.0023
0.618	0.0880	1.1595	0.7565	0.1996	1.8442	1.4380	0.3849
0.627	0.1682	0.8638	—	—	—	0.8411	0.5894
0.649	0.6078	1.4664	1.9273	0.7441	5.0021	1.5892	1.6116
0.660	—	1.1715	0.4720	0.4733	1.8546	1.6570	0.6439
0.675	0.8262	0.8313	3.9358	1.4968	2.6906	1.6155	0.9911
0.689	0.6156	1.1727	—	0.4215	1.0052	—	0.5895
0.695	0.8555	6.3009	0.6735	0.6808	2.6276	3.4175	1.5223
0.705(C <sub>13:0</sub> )	—	—	2.2000	0.8593	2.3853	1.5203	—
0.726(2OH-C <sub>12:0</sub> )	—	1.7848	—	—	1.3206	0.7889	—
0.743	0.4314	2.9302	0.9687	0.6814	2.7726	1.9412	1.1925
0.757	0.7901	2.8973	1.1900	0.9612	3.0924	2.2641	1.5287
0.769	—	1.5940	—	—	—	—	—
0.786	—	1.4649	—	—	—	—	—
0.796	0.8675	0.9513	1.1484	1.0078	3.7184	2.9295	2.0616
0.806(C <sub>14:0</sub> )	1.9644	3.7214	2.2339	2.5576	2.5364	4.2944	3.9729
0.824	—	2.0467	0.1031	—	1.3265	—	—
0.848	—	2.6217	—	—	1.0049	—	1.1849
0.858	0.1896	1.1629	—	0.9555	0.8658	—	—
0.868	—	0.9309	—	—	0.5466	—	—
0.882	0.0978	1.4787	0.4745	—	0.6026	0.2955	—
0.894	0.2475	0.8532	0.3763	0.6769	1.2327	1.0034	1.1420
0.906(C <sub>15:0</sub> )	0.4804	2.4225	1.0200	0.8028	1.3703	0.9816	1.0567
0.940	—	1.7760	0.6225	—	—	—	—
0.947(3OH-C <sub>14:0</sub> )	0.4361	1.5389	—	0.8010	0.5941	1.2818	1.0879
0.973(C <sub>16:1</sub> )	4.1272	2.8368	3.0980	6.3228	1.2342	5.0680	8.6093
0.990	—	1.6255	—	—	0.5906	0.6578	—
1.000(C <sub>16:0</sub> )	19.8796	8.1702	9.9815	16.6975	6.7461	14.1263	15.2324
1.080(C <sub>17:0</sub> )	—	1.2252	0.2693	0.5342	0.7573	0.6280	0.4843
1.137	4.4640	1.1399	1.1847	1.9718	—	1.3262	2.2194
1.146(C <sub>18:2</sub> )	12.5902	2.0379	2.5973	3.6356	0.5701	2.3506	—
1.153(C <sub>18:1</sub> )	—	1.6952	2.4828	7.1812	2.5491	5.1811	13.8012
1.173(C <sub>18:0</sub> )	11.7962	5.4752	7.1830	8.8591	5.0720	7.2524	5.8236
1.267	1.6614	—	—	0.7197	—	0.4856	0.6074
1.314(C <sub>19:0</sub> )	0.5580	0.1904	1.0298	1.9126	0.7439	0.7630	0.9635
1.412	0.7483	—	0.2754	0.9457	0.0662	0.2607	—
1.462	1.3188	—	1.3161	2.0383	—	1.7483	1.5943
1.476(C <sub>22:0</sub> )	0.6722	1.4844	2.1740	2.5418	3.4228	—	—

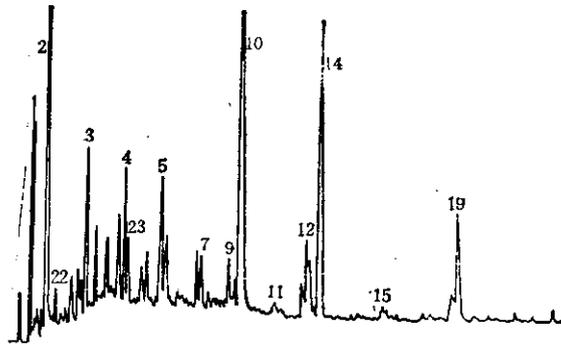


图 8 黑龙江立克次体 54 株的脂肪酸色谱图

Fig. 8 The chromatogram of fatty acids of *R. heilungkiangensis* 54

株、246 株、E 株和 Simko 株  $KV$ , 为 84%, 区别不太明显。改进的  $KV$ , 系数, 即  $KV'$ , 计算结果是: 已知 5 个参考株之间的  $KV'$ , 为 81.6—94.6%, 54 株与其他 6 株的  $KV'$ , 也在此范围内, 而精河株与 246 株的  $KV'$ , 为 97.0%。此结果与其他鉴别结果一致<sup>[8]</sup>, 精河株和西伯利亚 246 株相同。黑龙江 54 株的分类学位置有待进一步研究。

## 讨 论

研究立克次体的化学组分必须预先制备纯化物, 鉴于目前实验条件的限制, 规范化的纯品较难得到, 因此须用同一纯化方法得到的纯化物进行分析比较。本实验应用毛细管气相色谱法分析浓盐乙醚法纯化的立克次体酸性水解物, 初步确认被试的 7 株立克次体有 16 种脂肪酸, 并借助 Kulik-Vincent 相似系数及其改进式判别了实验毒株间的相似性。立克次体浓盐乙醚纯化法简便、经济、安全, 若不过分顾及纯化物的生物活性, 可以选用此法。

1981 年 Moss 等曾用填充柱气相色谱法分析斑点热、斑疹伤寒和 Q 热立克次体吸附层析纯化物的脂肪酸, 得到  $C_{18:1}$ 、 $C_{16:1}$ 、 $C_{16:0}$ 、 $C_{14:0}$ 、 $C_{19:0}$ 、 $C_{18:0}$ 、 $C_{12:0}$  和  $3OH-C_{14:0}$  等 8 种主要成分。这些结果和

本实验室所得纯化物的分析结果是一致的。本实验结果中的部分未知成分有待进一步鉴定。这不仅具有分类学意义, 而且对立克次体的生理生化和分子生物学研究也有一定意义。

此外, 通过实验得知, 一般选用 10 个立克次体生长良好的鸡胚卵黄膜的纯化物即可进行化学组分分析。样品水解物的处理应注意其连续性和一贯性, 尽量防止不饱和成分的氧化变性, 以保障结果的准确性。

## 参 考 文 献

- [1] 魏曦等主编: 医用立克次体学, 上海科学技术出版社, 上海, 1984。
- [2] 黄翠芬主编: 医用细菌分子生物学进展, 科学出版社, 北京, 第 107 页, 1984。
- [3] Tovarnickij, V. I. et al.: *Nature (London)*, **158**: 912, 1946。
- [4] 克瓦平斯基主编(赵大译): 分子微生物学, 科学出版社, 北京, 第 315 页, 1986。
- [5] 程光胜等主编: 分析微生物学专辑, 科学出版社, 北京, 第 69 页, 1988。
- [6] Winkler, H. H. and E. T. Miller: *J. Bacteriol.*, **136**:175—178, 1978。
- [7] Tzianabos, T. et al.: *J. Clin. Microbiol.*, **13** (3): 603—605, 1981。
- [8] 姜丹等: 中华微生物和免疫学杂志, **5** (4): 250—253, 1985。
- [9] 陈万荣等: 军事医学科学院院刊, **12**(6): 435—437, 1988。
- [10] Drucker, D. B.: *Microbiological Applica-*

tions of Gas Chromatography, Cambridge

University Press, p. 403, 1981.

## GAS CHROMATOGRAMS OF FATTY ACIDS FROM *RICKETTSIA* AND THEIR SIMILARITIES

Zhou Fang Xu Zhaoping Chen Liyin

Zhu Houchu Chen Xiangrui Wang Min

(Institute of Microbiology and Epidemiology, Fangsai, Beijing)

Fatty acid compositions of 7 strains of *Rickettsia* were analyzed by a on-line GC/MS system. These strains were *R. prowazekii* E, *R. conorii* Simko, *R. rickettsii* R, *R. sibirica* Barbash and 246, *R. sinxiangensis* Jinghe, and *R. heilungxiangensis* 54. The samples were purified by means of the concentrated salt-ether method. There were about 50 peaks in the fatty acid profiles, and 16 of these peaks were determined, i.e.  $C_{22:0}$ ,  $C_{19:0}$ ,  $C_{18:0}$ ,  $C_{18:1}$ ,  $C_{18:2}$ ,  $C_{17:0}$ ,  $C_{16:0}$ ,  $C_{16:1}$ , 3-OH- $C_{14:0}$ ,  $C_{15:0}$ ,  $C_{14:0}$ ,  $C_{13:0}$ , 2-OH- $C_{12:0}$ ,  $C_{12:0}$ , 2-OH- $C_{10:0}$ , and  $C_{11:0}$ . The major fatty acids were the saturated strai-

ght chain acids (e. g.  $C_{16:0}$ ,  $C_{18:0}$ ,  $C_{14:0}$ ) and the unsaturated straight chain acids (e.g.  $C_{18:1}$ ,  $C_{18:2}$ ,  $C_{16:1}$ ).

Similarities of fatty acid profiles of tested strains were discriminated by the improved Kulik-Vincent method. The result showed that the  $KV$ 's coefficient of strains Jinghe and 246 was 97.0%, and the  $KV$ ' coefficient of strains 54 and the others was 81.6—94.6%.

### Key words

*Rickettsia*; Fatty acid profiles; Similarity