

毛细管气相色谱细胞脂肪酸测定法鉴定 28 种分枝杆菌的研究

张寅 庄玉辉

(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)

用毛细管气相色谱对分枝杆菌属 28 种参考株的细胞挥发性脂肪酸进行测定, 发现均含有较多量的脂肪酸 $C_{16:1}$ 、 $C_{18:1}$ 及本属特异性组分 TBSA。利用色谱图中这三种脂肪酸峰高的比例关系, 可将所测菌株分成 8 群。再借助具有种间特异性的脂肪酸 $C_{19:1}$ 、 $C_{21:1}$ 和 $C_{24:1}$ 将其中的 17 株(60%)鉴定到种, 11 株鉴定到含有 2 或 3 个种的群。本鉴定程序区分多数临床常见的致病菌(如人型、牛型结核杆菌及一些分枝杆菌复合体), 经计算机对细胞脂肪酸模式的聚类分析, 表明了这一程序的客观合理性。

关键词 毛细管气相色谱; 分枝杆菌; 细胞脂肪酸; 聚类分析

目前, 临床对于分枝杆菌的鉴定所采用的传统方法仍很繁琐、费时。自 Reiner^[1]等最先将气相色谱技术(GC)引入分枝杆菌菌体成分测定以来, 很多报告结果均表明了这一方法在临床分枝杆菌属菌型鉴定应用的可行性^[2,3], 尤其是近年来毛细管色谱柱的应用, 以其更高的分辨率和灵敏度使 GC 检测微生物的工作达到了新的高度。Tisdall^[4]和 Mayall^[5]等分别用 GC 测定了 18 和 17 个种的分枝杆菌细胞脂肪酸(FA), 可将其中的 64% 及 58% 的菌株一次鉴定到种。但迄今仍缺少较为全面的本属细菌参考菌株的标准气相色谱图谱及利用细胞 FA 进行的鉴定程序, 影响了实验室间的对照及鉴定工作的广泛开展。

我们曾利用气相色谱测得 22 种分枝杆菌及相关菌的填充柱色谱, 并实现了 FA 组分的自动判别^[6]。现介绍通过毛细管气相色谱法进一步对 28 种标准分枝杆菌测定的结果。

材料与方 法

(一) 菌种来源

表 1 所列菌种均由中国药品生物制品检定所提供, 来源于加拿大。

(二) 菌样制备

标准抗酸分枝杆菌的制备见前文^[7]。

(三) 全细胞脂肪酸甲基酯的提取^[8]

称取冻干菌体 1—3mg, 置玻璃安瓿瓶中, 加 1ml 甲醇-甲苯-硫酸(30:15:1 V/V/V)水解液, 小心熔封安瓿瓶, 75℃ 水浴过夜(16—18 小时)。冷却后加入石油醚 2ml 充分混合, 取上层石油醚提取液, 通过用吸管制备的碳酸氢胺小柱(管柱用乙醚预洗一次), 洗脱液氮气吹干后用 100 μ l 正己烷(分析纯)溶解备用, 每次进样量 1 μ l。

标准脂肪酸甲酯试剂: 配制 $C_{8:0}$ — $C_{22:0}$

本文于 1989 年 11 月 18 日收到。

部分工作得到中国科学院微生物研究所赵玉峰、马俊才帮助, 谨此致谢。

表 1 供试菌株一览表
Table 1 List of strains tested

测试菌株 Tested strains	菌株号 Strains number	来源 Source
人型结核杆菌 <i>M. tuberculosis</i> H37Rv	93301	TMC 102
人型结核杆菌 <i>M. tuberculosis</i> H37Ra		Not known
牛型结核杆菌 <i>M. bovis</i>	93302	TMC 410
牛型结核杆菌 <i>M. bovis</i> BCG		TMC 1011
堪萨斯分枝杆菌 <i>M. kansasii</i>	93304	TMC 1204
海分枝杆菌 <i>M. marinum</i>	93305	TMC 1218
猿分枝杆菌 <i>M. simiae</i>	93306	TMC 1595
苏尔加分枝杆菌 <i>M. szulgai</i>	93309	NCTC 10831
戈登分枝杆菌 <i>M. goodii</i>	93308	TMC 1324
瘰癧分枝杆菌 <i>M. scrofulaceum</i>	93307	TMC 1323
鸟分枝杆菌 <i>M. avium</i>	93315	TMC 724
胞内分枝杆菌 <i>M. intracellulare</i>	93314	TMC 1406
胃分枝杆菌 <i>M. gastri</i>	93310	TMC 1456
溃疡分枝杆菌 <i>M. ulcerans</i>	93317	NCTC 10417
懒分枝杆菌 <i>M. xenopi</i>	93316	TMC 1470
土分枝杆菌 <i>M. terrae</i>	93312	TMC 1450
不产色分枝杆菌 <i>M. nonchromogenicum</i>	93311	TMC 1481
次要分枝杆菌 <i>M. triviale</i>	93313	TMC 1453
耻垢分枝杆菌 <i>M. smegmatis</i>	93321	TMC 1546
草分枝杆菌 <i>M. phlei</i>	93318	ATCC 11758
金黄分枝杆菌 <i>M. aurum</i>		Not known
微黄分枝杆菌 <i>M. gilvum</i>	93322	ATCC 14474
牡牛分枝杆菌 <i>M. vaccae</i>	93319	TMC 1526
偶发分枝杆菌 <i>M. fortuitum</i>	93323	ATCC 14467
副偶发分枝杆菌 <i>M. parafortuitum</i>	93324	TMC 1529
龟分枝杆菌龟亚种 <i>M. chelonae</i> subsp. <i>chelonae</i>	93326	TMC 1544
龟分枝杆菌脓肿亚种 <i>M. chelonae</i> subsp. <i>abscessus</i>	93325	ATCC 19977
迪氏分枝杆菌 <i>M. diernhoferi</i>	93320	TMC 1540

注: TMC: 美国分枝杆菌保藏中心 Mycobacterial Culture Collection.

ATCC: 美国标准菌种保藏中心 American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, USA.

NCTC: 英国国立标准菌种保藏中心 National Collection of Type Cultures, London, UK.

直链饱和及部分不饱和脂肪酸甲酯正己烷液 (SIGMA)。支链脂肪酸甲酯如 10-甲基结核硬脂酸(10-methyl-tuberculostearic acid, TBSA) 等的位置, 参照 Tisdall^[4] 质谱定性结果确认。

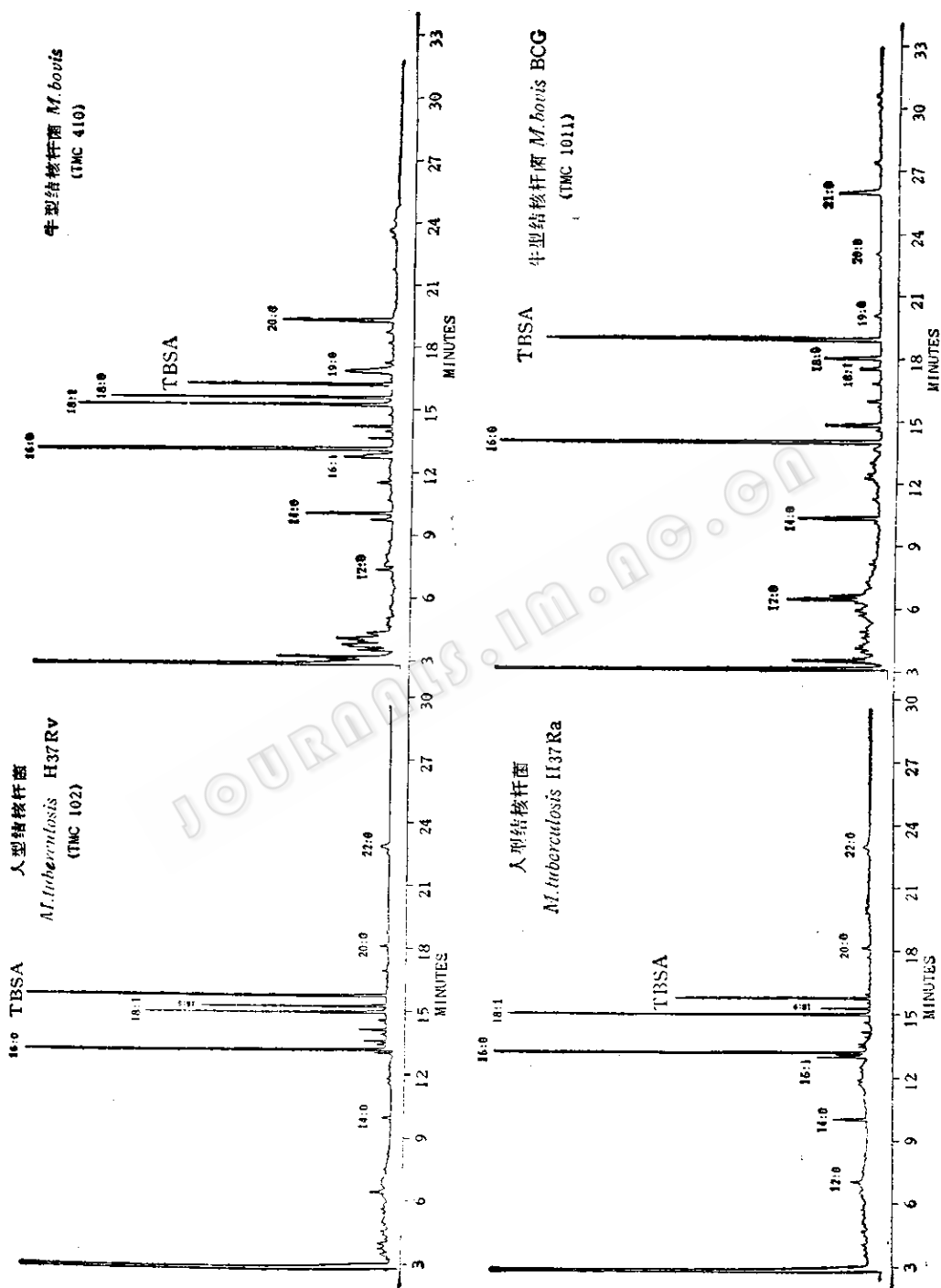
(四) 仪器工作条件

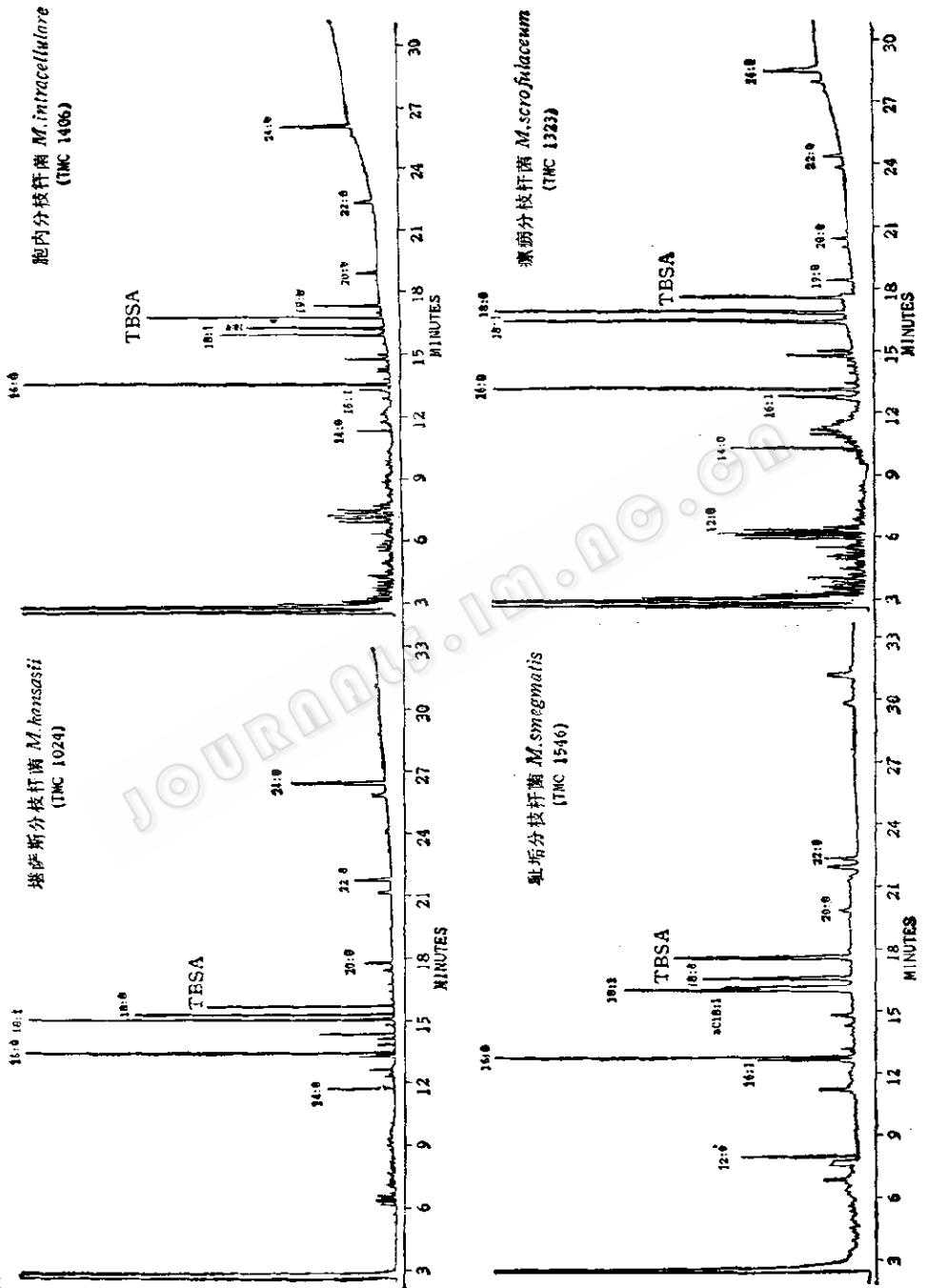
气相色谱仪为岛津 GC-14A 型配有 C-R4A 微机数据处理器, 氢火焰鉴定器 (FID)。色谱柱为 25m 化学键熔融石英毛细管柱 (岛津公司, 弱极性柱)。二阶程

序升温 40℃—(8℃/min)—160℃—(4℃/min)—280℃。鉴定器及注射室温度均为 280℃; 载气及尾气 (高纯氮) 60ml/min; 高纯氢 0.5kg/cm², 空气 0.5kg/cm²。进样分流比 50:1。

结 果

抗酸分枝杆菌属的细菌脂肪酸含量较其它细菌更为丰富, 利用熔融石英毛细管色谱柱可得到一百多个 FA 组分。我们发现





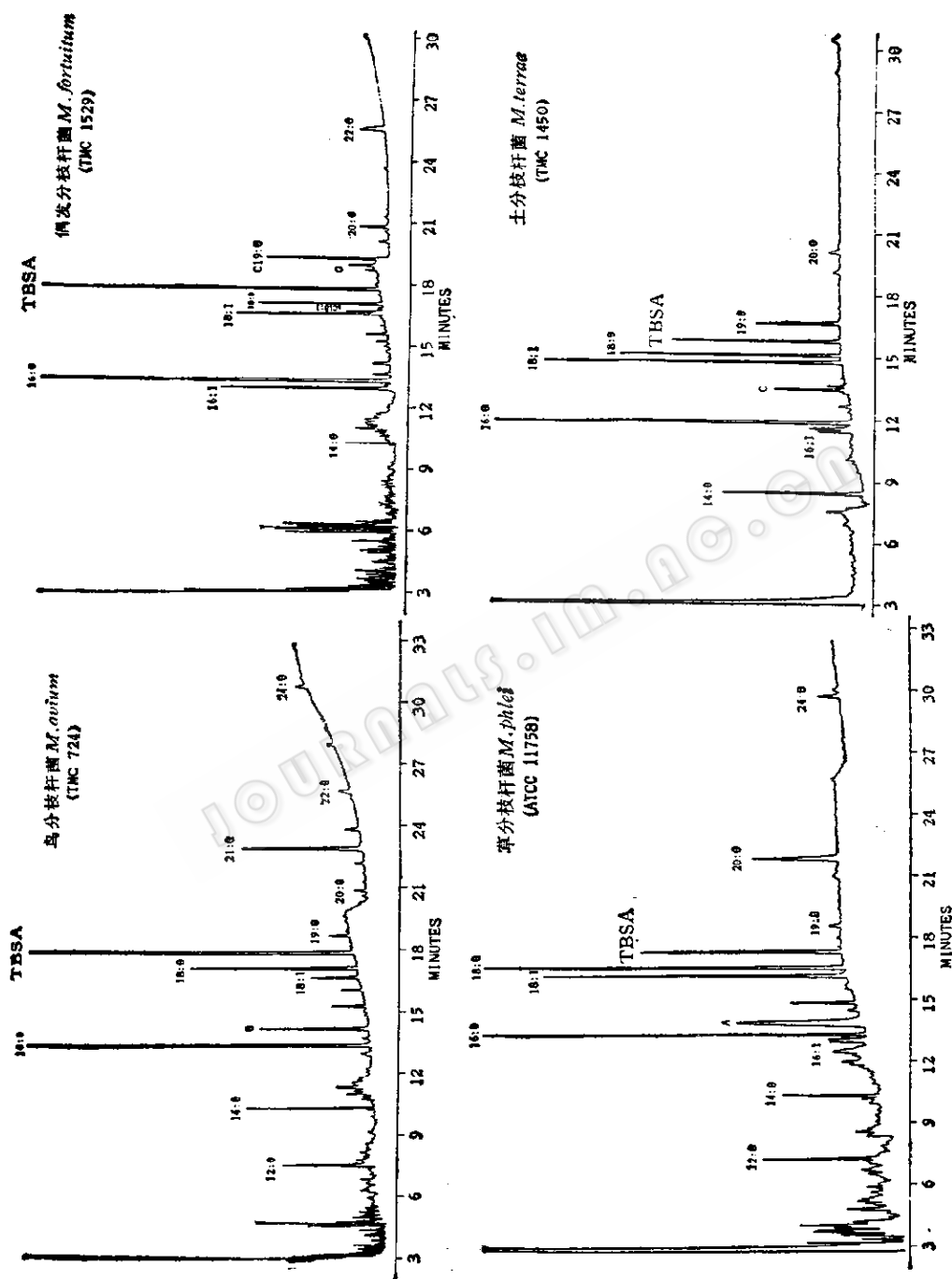


图 1 12 种标准分枝杆菌细胞脂肪酸气相色谱图

Fig. 1 Gas chromatograms of cellular fatty acids of 12 standard *Mycobacterium* sp.

表 2 抗酸分枝杆菌属
Table 2 Cellular fatty acids

菌株 Species	C _{12:0}	C _{14:0}	iC _{16:1}	C _{16:1}	C _{16:0}	A	B	C	D	E
<i>M. tuberculosis</i> H37Rv 93301	1.5	1.3	—	3.7	44.5	T	1.1	T	1.2	T
<i>M. tuberculosis</i> H37Ra	5.1	6.5	3.7	1.6	40.6	0.5	T	T	0.5	T
<i>M. bovis</i> 93302	2.6	3.0	—	3.7	31.8	1.1	0.5	1.9	—	T
<i>M. bovis</i> BCG	6.8	5.6	—	—	34.0	T	5.0	T	1.1	0.7
<i>M. kansasii</i> 93304	9.7	3.2	2.3	0.5	34.0	T	1.3	1.0	2.8	0.8
<i>M. marinum</i> 93305	1.8	3.6	5.8	4.8	24.9	T	1.8	1.1	1.2	T
<i>M. simiae</i> 93306	8.1	6.7	2.7	1.4	38.7	T	T	T	0.6	T
<i>M. szulgai</i> 93309	T	3.0	—	5.5	36.5	T	1.1	T	0.7	T
<i>M. goodii</i> 93308	6.7	2.8	0.9	0.6	40.9	T	0.6	0.6	2.5	T
<i>M. scrofulaceum</i> 93307	1.2	5.5	—	4.6	36.6	0.5	T	2.6	1.2	—
<i>M. avium</i> 93315	T	4.9	—	0.9	32.2	0.5	5.0	T	1.2	0.9
<i>M. intracellulare</i> 93314	0.9	5.2	—	3.0	31.0	T	1.5	3.0	1.4	T
<i>M. gastri</i> 93310	T	6.1	—	4.6	32.0	T	0.5	0.5	1.5	T
<i>M. ulcerans</i> 93317	7.5	5.9	—	0.8	33.0	2.6	1.6	2.0	T	T
<i>M. xenopi</i> 93316	13.5	3.2	1.5	3.2	39.8	0.6	2.8	0.6	1.7	1.7
<i>M. terrae</i> 93312	0.6	5.9	1.5	1.7	35.5	T	0.6	3.4	1.0	—
<i>M. nonchromogenicum</i> 93311	10.3	5.0	2.5	2.5	26.8	2.5	1.7	7.1	T	T
<i>M. triviale</i> 93313	T	2.8	1.0	2.2	45.2	T	3.3	T	1.9	T
<i>M. smegmatis</i> 93321	1.7	3.9	—	4.9	35.9	T	0.5	T	T	0.6
<i>M. phlei</i> 93318	11.9	2.6	1.7	1.5	29.8	12.8	0.7	2.2	—	—
<i>M. aurum</i>	0.8	3.2	—	4.8	41.6	T	1.2	T	0.8	T
<i>M. gilvum</i> 93322	4.3	6.7	1.7	2.4	36.5	T	T	5.5	1.3	T
<i>M. vaccae</i> 93319	T	2.7	—	8.7	36.3	T	6.8	2.7	T	T
<i>M. parafortuitum</i> 93324	8.3	5.6	—	3.8	40.7	T	0.5	T	T	T
<i>M. fortuitum</i> 93323	3.7	7.4	—	6.3	35.3	0.6	1.0	T	0.5	0.8
<i>M. chelonae</i> subsp. <i>chelonae</i>	15.1	14.3	—	—	19.5	11.5	T	T	5.9	T
<i>M. chelonae</i> subsp. <i>abscessus</i>	T	2.9	—	3.9	49.0	1.6	T	T	1.5	T
<i>M. diernhoferi</i> 93320	4.9	5.0	—	5.9	32.2	T	T	1.6	1.3	1.4

注：脂肪酸名冒号左为碳原子数，右为双键数；“—”：未测出峰值；“T”：色谱峰高百分值 < 0.5%；A、B、C、D、E、F、G、H、I、J 和 K：Unknown patterns。
Notes: The figure before the colon indicates number of carbon atoms in the FA chain, the one after height < 0.5%; A, B, C, D, E, F, G, H, I, J and K: Unknown patterns.

十碳脂肪酸(C_{10:0})前的 60 多个挥发性 FA 无属内种间定性和定量的差别，故通过微机程序设置将这部分色谱峰消去。而在 C_{12:0} 到 C_{26:0} 间的许多 FA 却存在种间量和质的不同，这些脂肪酸对本属菌的区别是有意义的。我们以标准 FA 做外标定性，将组分的出峰保留时间(RT)及名称输入计算机，以保留时间的 1% 为微机的识别窗口，微机则将在窗口时间带区中出现的样品组分峰识别并打印出峰强度及名称。

表 2 为用 GC 将所测定的 28 种标准分枝杆菌以面积归一化法列出的细胞脂肪酸组分百分含量。图 1 则为分枝杆菌细胞脂肪酸 GC 图谱。

试验结果可以看出，C_{12:0}、C_{14:0}、C_{16:0}、C_{18:1}、C_{18:0}、TBSA 和 C_{22:0} 被试菌株均有，部分菌株有种特异性 FA。我们观察到，TBSA 在人型结核杆菌 H37Rv 中多于 C_{18:1} 和 C_{18:0}，在人型结核杆菌 H37Ra 中则介于二者之间；脂肪酸 C_{19:0} 在牛型结核杆菌中

菌体细胞脂肪酸组分

compositions of mycobacteria

C _{16:1}	aC _{18:1}	C _{18:0}	F	TBSA	G	C _{19:0}	H	C _{20:0}	C _{21:0}	I	C _{22:0}	J	C _{24:0}	K	C _{26:0}
12.2	—	8.8	—	21.2	—	T	T	0.6	—	T	0.9	T	T	T	0.6
23.4	—	3.2	—	13.6	—	T	—	0.6	—	—	0.7	—	T	T	T
15.5	—	14.6	—	10.9	—	7.8	—	5.7	—	T	1.0	—	—	—	—
1.9	—	5.2	—	31.8	—	0.7	—	0.5	5.9	—	0.7	—	—	—	—
17.4	—	9.0	—	7.7	—	T	1.0	0.8	—	1.2	1.9	T	5.2	—	—
30.7	—	5.8	—	8.4	—	T	—	0.6	—	—	2.2	2.4	3.9	—	1.0
23.2	—	2.7	—	11.9	—	T	—	T	—	—	T	—	3.9	—	T
20.8	—	7.8	T	6.1	0.7	T	—	2.1	—	—	2.6	0.7	12.3	—	—
16.2	—	17.5	—	6.7	—	T	T	0.7	—	1.4	1.7	—	—	—	—
12.9	—	13.1	—	5.9	—	2.0	0.7	1.5	—	0.8	2.7	1.5	6.5	—	—
2.5	—	6.2	—	34.7	—	0.9	—	—	6.5	—	0.8	—	0.7	—	2.0
11.1	—	9.0	—	15.8	—	5.5	T	1.7	—	—	2.6	0.5	7.3	—	0.6
21.3	—	13.7	—	11.2	—	T	T	1.5	—	T	2.0	—	5.1	—	—
23.1	—	7.5	—	4.9	—	4.1	—	2.2	—	—	T	—	4.6	—	—
10.4	—	10.9	—	10.6	—	T	—	1.4	—	T	T	—	—	—	—
17.7	—	12.8	—	9.6	—	5.4	0.5	0.8	—	T	0.6	0.9	1.5	—	—
11.9	—	9.9	2.4	3.3	—	0.7	0.6	6.9	—	0.8	4.9	—	—	—	0.5
11.0	—	15.0	—	12.5	—	T	T	1.6	—	T	0.9	T	2.4	—	—
10.5	7.5	6.8	—	8.3	—	0.5	1.9	1.5	—	0.8	2.3	3.8	8.3	—	—
10.2	—	13.6	—	7.2	—	0.5	—	3.8	—	—	1.5	—	—	—	—
19.0	—	8.4	—	6.2	T	T	—	2.1	—	—	2.7	0.6	8.5	—	—
16.7	—	11.4	—	8.7	—	4.7	T	T	—	T	T	—	—	—	—
23.0	—	11.0	—	1.4	—	—	—	1.4	—	4.1	1.9	—	—	—	—
9.2	5.4	6.8	—	8.3	—	1.8	0.9	1.2	—	T	1.2	1.5	4.7	—	—
4.9	1.3	4.2	—	17.1	1.2	4.2	0.8	2.3	—	—	3.9	T	4.3	T	T
5.0	—	8.9	—	9.8	—	—	T	—	—	9.2	—	—	—	—	—
20.0	—	13.3	—	6.3	—	—	T	1.6	—	—	T	—	—	—	—
19.8	—	11.5	—	6.4	—	7.6	0.5	1.3	T	T	1.6	T	T	T	—

E、F、G、H、I、J、K 均为未知成分。

the colon denotes the number of double bonds; “—”: Undetected peaks; “T”: The percentage of peak

含量最为丰富 (7.8%), C_{20:0} 也很丰富, C_{18:1} 与 C_{18:0} 的 GC 峰近似等高。牛型结核杆菌 BCG 株的 GC 特征是 C_{18:1} 含量最少 (1.9%), C_{21:0} 较多 (5.9%)。

脂肪酸 C_{16:0} 在所有被测菌株中峰强均为最高, 但在海分枝杆菌和鸟分枝杆菌中例外, 前者 C_{18:1} 超过该峰; 后者 TBSA 超过该峰 (34.7%), 其另外的特点是 C_{21:0} 丰富 (6.5%) 及 C_{21:1} 峰值低 (2.5%), 借此可将鸟分枝杆菌与胞内分枝杆菌相区别, 而

用常规方法则很难将这一复合体区分开。

主要脂肪酸峰序呈 C_{18:0} > TBSA > C_{18:1} 型仅在次要分枝杆菌中出现, 而该三种组分在蟾分枝杆菌 GC 图谱中则近乎等高。不产色分枝杆菌的 C_{22:0} 含量丰富 (4.9%); 迪氏分枝杆菌发现有较多的 C_{19:0} (7.6%); 在苏尔加分枝杆菌和金黄分枝杆菌的 TBSA 与 C_{19:0} 间测到一特异的未知成分 G; 含 C_{18:0} 最多的是戈登分枝杆菌 (17.5%)。

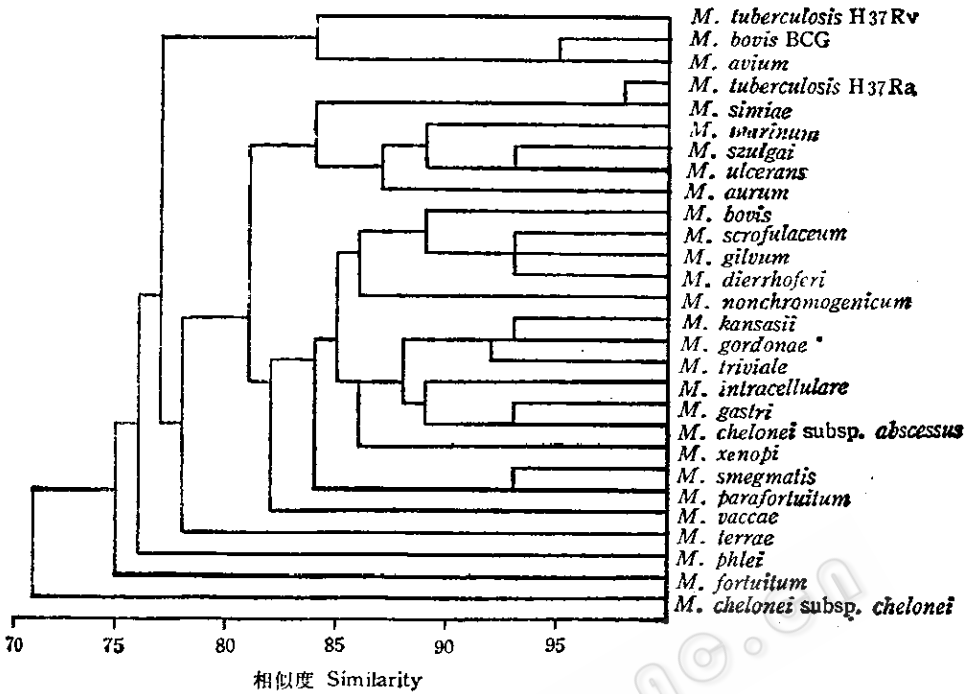


图 3 分枝杆菌细胞脂肪酸组分平均连锁聚类树状谱

Fig. 3 Dendrogram showing relationship between *Mycobacterium* sp. based upon cellular FA profiles, obtained by average-linkage cluster analysis

脂肪酸 $a_{C_{18:1}}$ 仅发现于耻垢分枝杆菌、副偶发分枝杆菌和偶发分枝杆菌, 含量分别为 7.5%、5.4% 和 1.3%。

我们试利用一组重现好且具有鉴定意义的相邻脂肪酸 $C_{18:1}$ 、 $C_{18:0}$ 和 TBSA 的峰高比例关系将 28 种分枝杆菌分为 8 群, 再借助较为特异的 FA 如 $C_{19:0}$ 和 $C_{21:0}$ 等则可进一步将其中的 17 种 (60%) 一次区分至种的水平 (图 2)。这一结果与 Tisdall 的观点近似^[4], Knisley^[12] 也认为该组脂肪酸对分枝杆菌属有重要的区分作用。

另外, 我们还利用中国科学院微生物研究所 MINTS 数值分类系统对所测脂肪酸以平均连锁法 ($S_a = 2a/2a + b + c + d$) 进行聚类分析 (图 3), 以期展示本属细菌菌株间通过细胞 FA 组分表达出的亲疏关系。

从树状谱可以看出, 人型结 核 杆 菌

H37Ra 与猿分枝杆菌的相似性为 98%, 这两种菌在 GC 图谱上峰型也十分相同。同样, 脂肪酸色谱图相像, 且在图 2 被分到一群或同一区段中的牛型结核杆菌 BCG 株与鸟分枝杆菌、耻垢分枝杆菌与副偶发分枝杆菌、堪萨斯分枝杆菌与戈登分枝杆菌的聚类分析均达到 93% 的相似度。这一结果支持了本文所提出的分枝杆菌细胞脂肪酸 GC 鉴定程序。

讨 论

欲将细菌细胞脂肪酸 GC 测定这一方法引进临床实验室, 首先应解决实验室间的重现性问题及需要一套可用作对照的标准分枝杆菌的 GC 图谱^[1]。我们所测得的人型结核杆菌 H37Rv 株的主要峰型 ($C_{18:1}$ 、 $C_{18:0}$ 和 TBSA) 与 Larsson^[10] 和 Guerrant^[11] 得到的这三个脂肪酸峰型比例一致, 与

Knisley^[12]和 Lambert^[13]所测得的 H37Ra 株结果一致。对于堪萨斯分枝杆菌 GC 特征,我们获得了与几家实验室相同的结论,即上述三个 FA 峰依次降低^[10,12,13]。我们观察到鸟分枝杆菌 GC 峰型特征为 $TBSA > C_{18:0} > C_{18:1}$, 与 Larsson 的结果一致,也有认为是 $C_{18:1} > TBSA > C_{18:0}$ 的^[11,13]。

偶发分枝杆菌在本实验及现有文献来看,存在几种不同的结果。本实验所得到的耻垢分枝杆菌 GC 图与 Lambert 测得的图形吻合,均发现含量较多的特异脂肪酸 $aC_{18:1}$, 而利用填充柱则不易测到这一成分^[13]。其它分枝杆菌由于尚缺乏文献报道而无法比较。

由于细胞 FA 组分受到细胞基因控制,主要 FA 含量较为恒定,本实验获得了满意的 GC 图谱重现,与过去我们用填充柱得到的结果也吻合。从结果看,部份菌种实验室间的重复性也比较理想,但也不排除菌株间的变异。

鉴于细胞碱性水解法较繁琐且重现性不佳^[11],所以我们采用了酸性水解法。该法不破坏长链 FA,冻干及湿菌体均可应用,且同一水解产物还可同时进行分枝杆菌枝菌酸甲基酯的测定^[7]。作者用熔封安瓿进行水解可避免水解液蒸发,效果比较好,一般 1—3mg 菌粉即可获得满意的 GC 图谱。

我们采用无分流进样方式,可使检测灵敏度达到 $10\mu\text{g}$ (冻干菌粉)。

综上所述,本实验结果不仅表明气相色谱法在细菌鉴定方面显示出的快速、灵敏、重复性强,而且借助计算机可使分析过程达到自动化,展示了这一方法有临床应用的前景,有可能成为分枝杆菌菌型鉴定的一种辅助手段。

参 考 文 献

- [1] Reiner, E. et al.: *Am. Rev. Respir. Dis.*, **90**: 42, 1969.
- [2] Ohashi, D. K. et al.: *J. Clin. Microbiol.*, **6**: 469, 1977.
- [3] 周方等: 中华结核和呼吸杂志, **6**(2): 65—67, 1983.
- [4] Tisdall, P. A. et al.: *J. Clin. Microbiol.*, **10**: 506—514, 1979.
- [5] Mayall, B. et al.: *Pathology*, **17**(1): 24—28, 1985.
- [6] 张寅等: 中华结核和呼吸杂志, **12**(2): 105—108, 1989.
- [7] 庄玉辉等: 微生物学报, **29**(1): 15—19, 1989.
- [8] Minnikin, D. E. et al.: *J. Chromatogr.*, **188**: 221, 1980.
- [9] Larsson, L. et al.: *J. Microbiol. Methods*, **3**(2): 77, 1984.
- [10] Larsson, L. et al.: *J. Clin. Microbiol.*, **3**: 81, 1976.
- [11] Guerrant, G. O. et al.: *ibid.*, **13**: 899—907, 1981.
- [12] Knisley, C. V. et al.: *ibid.*, **22**: 761—767, 1985.
- [13] Lambert, M. A. et al.: *ibid.*, **23**: 731—735, 1986.

IDENTIFICATION OF TWENTY-EIGHT SPECIES MYCOBACTERIA WITH THEIR CELLULAR FATTY ACIDS BY CAPILLARY GAS CHROMATOGRAPHY

Zhang Yin Zhuang Yuhui

(Tuberculosis Centre, 309th Hospital, Beijing)

Liu Zhiheng Ruan Jisheng

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing)

Cellular fatty acid (FA) of 28 species of mycobacteria were analysed by capillary gas chromatography (GC). There were more than sixty volatile FA before $C_{12:0}$ have no any difference between species both in quality and quantity. The identification scheme of *Mycobacterium* based on cellular FA was presented here. According to this scheme, all the tested species could be divided into 8 groups by the FA peak height order of $C_{18:1}$, $C_{18:0}$ and TBFA which were quite stable; after that, 17 species (60%) might be identified to species

level with help of some distinctive FA such as $C_{19:0}$, $C_{21:0}$. Most pathogenic bacteria could be separated by the scheme (*M. tuberculosis*, *M. bovis* and some complexes). This scheme was also demonstrated to be objective rationality by computer cluster analysis with cellular FA components.

Key words

Capillary gas chromatography; *Mycobacterium*; Cellular fatty acid; Cluster analysis