

气相色谱-质谱法对斑点热群立克次体 中国分离株的识别研究*

周玲 范明远 陈剑鸥 蔡虹

(中国预防医学科学院流行病学微生物学研究所, 北京 102206)

周方 朱厚础

(军事医学科学院微生物学流行病学研究所, 北京 100071)

本文报告应用气相色谱-质谱法分析了 13 株斑点热群立克次体 (7 株中国分离株和 6 株国际标准株) 泛影葡胺密度梯度离心纯化物的全细胞脂肪酸成分。结果表明, 各被检测的立克次体株所含主要脂肪酸成分百分含量有区别, 所得色谱图经多元聚类法处理的 7 株中国分离株与国际标准株中的西伯利亚立克次体相近, 而与其它国际标准株则有明显区别。

关键词 斑点热群立克次体; 西伯利亚立克次体; 脂肪酸; 气相色谱-质谱法

《Bergey's 系统细菌学手册》中记载对人类有致病性的斑点热群 (Spotted Fever Group, SFG) 立克次体共有五种, 其中引起北亚蜱传斑点热 (North Asia Tick Borne Spotted Fever) 简称北亚热 (North Asia Fever) 的西伯利亚立克次体 (*Rickettsia sibirica*) 主要分布在俄罗斯和蒙古国一带。1958 年在我国内蒙锡盟阿旗健康人群血清学调查中, 发现有抗 SPG 立克次体中的西伯利亚立克次体和引起立克次体痘的小株立克次体 (*Rickettsia akari*) 的抗体, 指出在我国可能存在有上述两病^[1]。其后, 在临床上虽然不断观察到类似斑点热的病人, 但缺少病原学证据, 故难以确诊。直到 1984 年在新疆精河县才从北亚热病人中分离出 1 株立克次体 (An-84), 这是我国首例报道^[2]。其后于 1985 年在内蒙呼盟陈旗及 1988 年在内蒙哲盟通辽市从北亚热病人中再次分离出立克次体 (Se-85 及 W-88 株),^[3,4]从精河县和陈旗同时从草原革蜱 (*Dermacentor nuttalli*) 及其蜱卵中也分离出同一性质立克次体 (FT-84, MT 84 及 TO-85 株)。用分子流行病学方法对该病进行了深入研究, 终于阐明了该病性质。

近年国外学者曾用裂解气相色谱法分析了立克次体的脂肪酸, 试图从化学组成上进行分类研究^[5,6], 国内学者曾用该法研究了斑点热立克次体^[7,8]和 Q 热立克次体^[9]。作者等试用气相色谱-质谱联用系统对 SFG 立克次体中国分离株中的一株 (W-88 株) 在种的水平上进行鉴定分析, 效果较好^[10]。本文报道用气相色谱-质谱法分析立克次体泛影葡胺密度梯度离心纯化物的脂肪酸成分, 并用聚类方法解析色谱图, 以探讨 SFG 立克次体 7 株中国分离株 (包括我国参考株 JH-74 蜱株) 和 6 株国际标准株间的分类学关系。

本文于 1992 年 5 月 5 日收到。

*国家自然科学基金资助课题。

材 料 和 方 法

(一) 菌株

中国分离株和国际标准株其立克次体名称、株名及来源详见表 1、表 2。

表 1 斑点热群立克次体中国分离株

Table 1 Spotted fever group rickettsiae isolated strains in China

菌株名称 Name of strain	来源 Source	分离地点 Isolated location	分离单位 Isolated organization	分离年代(年) Isolated date
An-84	病人 patient	新疆精河 Jinxe, Xinjiang	中国预防医科院流研所 Chinese Academy of Preventive Medicine	1984
FT-84	雌婢 <i>D. nuttalli</i> (female)	同上 ibid	同上 ibid	1984
MT-84	雄婢 <i>D. nuttalli</i> (male)	同上 ibid	同上 ibid	1984
Se-85	病人 patient	内蒙陈旗 Cheng Qi, Inner Mongolia	同上 ibid	1985
TO-85	婢卵 <i>D. nuttalli</i> (Egg)	同上 ibid	同上 ibid	1985
W-88	病人 patient	内蒙通辽 Tunliao, Inner Mongolia	同上 ibid	1988
JH-74	婢 <i>D. nuttalli</i>	新疆精河 Jinxe, Xinjiang	新疆军事医学研究所 Institute of Military Medical Sciences, Xinjian	1974

表 2 斑点热群立克次体国际标准株

Table 2 Prototype strains of spotted fever group rickettsiae

菌种 名称 Name of species	菌株 名称 Name of strain	菌种来源 Source
小蛛立克次体 <i>R. akari</i>	Kaplan	美国 ATCC ATCC USA
澳大利亚立克次体 <i>R. australis</i>	W 58	美国哥伦布 Dept. of Health Lab Columbus, OH USA
西伯利亚立克次体 <i>R. sibirica</i>	232	同上 ibid
西伯利亚立克次体 <i>R. sibirica</i>	246	军事医学科学院 Academy of Military Medical Sciences
康氏立克次体 <i>R. conorii</i>	Simko	同上 ibid
立氏立克次体 <i>R. rickettsii</i>	R	同上 ibid

(二) 立克次体培养物纯化法

按 Hanson 法^[11] 略加改进。

1. 差速离心:

(1) 用匀浆器磨碎感染立克次体的鸡胚卵黄囊, 用 50% 蔗糖缓冲液稀释 (0.5ml/ 卵黄囊) 每 5ml 卵黄囊液加 100 μ l PMSF(蛋白酶抑制剂) 混匀; (2)150 \times g 离心 10min 去除大组织块, 收取上清液, 用 50% 蔗糖缓冲液悬浮 (0.5ml/ 卵黄囊); (3)150 \times g, 10min, 合并两次上清液; (4)22500 \times g, 20min, 弃上清液, 沉淀物用 6% BSA(牛血清白蛋白) 液悬浮 (1—2ml/ 卵黄囊 6%BSA 液); (5) 水浴静置 1 h; (6)200 \times g,10min 弃沉淀物收上清液; (7)22500 \times g,20min, 弃上清液, 沉淀物用 5ml SPG(蔗糖-磷酸盐-谷氨酸缓冲液) 悬浮; (8) 加 DNA 酶 I 或 RNA 酶 0.5mg/ml 卵黄囊处理 30min;(9)22500 \times g,20min,(10)5ml SPG 悬浮。

2. 超速离心:

(1) 用 SPG 缓冲液稀释 76% 泛影葡胺(肾造影剂) 为 30%—36%—42%; (2) 用毛细管将上述三种浓度的泛影葡胺从高浓度按 1:2:2 比例依次加入离心管中, 使其形成梯度, 然后将立克次体悬液加入液面上; (3)65000 \times g 75min 分层为轻带(L) 和重带(H); (4) 取出轻带、重带分别加 10ml SPG 混匀后, 再 22500 \times g,20min;(5) 弃上清液, 用 1ml SPG 悬浮纯化立克次体, 置 -70 $^{\circ}$ C 备用。

(三) 立克次体纯化物脂肪酸甲酯制备

取 1—1.5ml 立克次体纯化物(轻带) 放入 5ml 带螺帽离心管内, 用氮气吹干后加入 2.0ml 2mol/L 的 HCl-CH₃OH 水解液, 充氮气密封, 90—95 $^{\circ}$ C 水解 7h, 放置室温后再用干燥氮气将反应液吹至原体积 1/2。用正己烷提取 2 次, 每次 1ml, 合并提取液用氮气吹干。残留物用 1ml 正己烷溶解, 再加入 1/2 体积的硅藻土(80—100 目), 充分混匀后放 4 $^{\circ}$ C 静置过夜, 1500 \times g 1h。回收上清液供分析用。

(四) 气相色谱和气相色谱-质谱分析

方法见参考文献 [12]。

(五) 气相色谱的聚类解析

方法见参考文献 [13]。

结 果

立克次体纯化培养物的脂肪酸色谱图和已知标准脂肪酸试剂色谱图相对照, 确定色谱峰代表的成分名称, 主要成分再经气相色谱-质谱法核实。

主要成分有棕榈酸(C16:0) 和硬脂酸(C18:0), 其次是亚油酸(C18:2) 棕榈油酸(C16:1) 和油酸(C18:1)。

某些菌株含有少量肉豆蔻酸(C14:0)、十五烷酸(C15:0)、 β -羟基-肉豆蔻酸(β -OH-C14:0)、十七碳酸(C17:0)、十九烷酸(C19:0)、花生四烯酸(C20:4); 有的可见微量二十一烷酸(C21:0)、二十二烷酸(C22:0) 等。菌株色谱图间的区别主要在于脂肪酸成分的百分含量。图 1 为西伯利亚立克次体 232 株脂肪酸色谱图; 图 2 为中国分离株 An-84 株脂肪酸色谱图。



图 1 西伯利亚立克次体 232 株脂肪酸气相色谱图

Fig. 1 Gas chromatogram of methylated fatty acids of *R. sibirica* (strain 232)

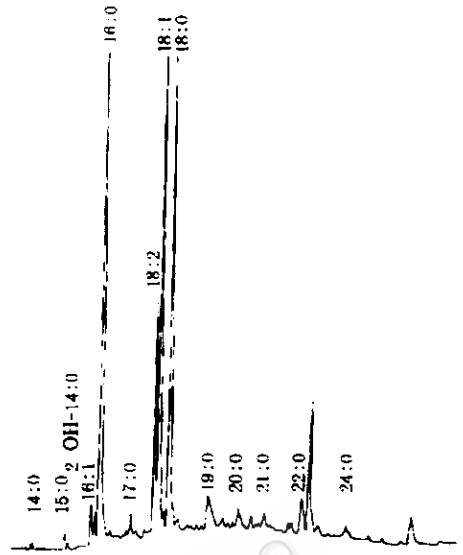


图 2 An-84 株脂肪酸气相色谱图

Fig. 2 Gas chromatogram of methylated fatty acids of An-84 strain

根据各菌株脂肪酸色谱图的定量分析数据用欧氏距离单链锁法 (Simple Linkage) 进行多元聚类分析, 在聚类树状谱中显示出实验菌株的亲缘关系 (图 3)。在纵坐标欧氏距离 2.25 处实验菌株被分为三群, 即所有中国分离株与西伯利亚立克次体国际标准株聚在一大群内。其中还可看出不同地区来源的菌株间的差异, 新疆株和内蒙株各自成一群, 但不同宿主来源的菌株尚难以看出其差异性。国际标准株中的西伯利亚立克次体 232 (人株) 和 246 (蜱株) 两株之间关系并非十分密切, 相对而言 JH-74 (蜱株) 与 246 株似更为接近。在欧氏距离 2.25 阈值下, 康氏立克次体自成一

群, 立氏、小株和澳大利亚立克次体则为另一群, 而与西伯利亚立克次体关系较远。在相同的实验方法和条件下得到的正常鸡胚卵黄囊对照物色谱图中, 只出现微量棕榈酸和硬脂酸。西伯利亚立克次体 (232 株) 脂肪酸甲脂的质谱分析结果见表 3。

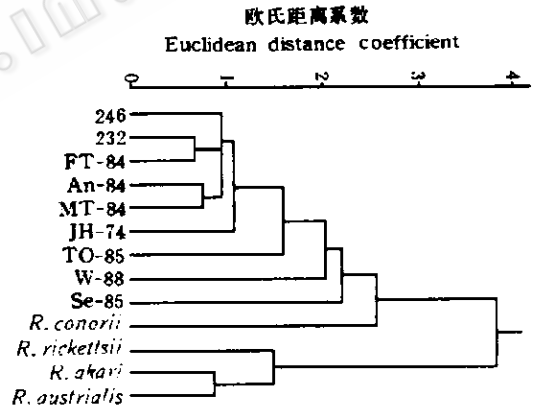


图 3 用系统聚类方法 (单链锁) 斑点热群立克次体脂肪酸色谱图的树状谱

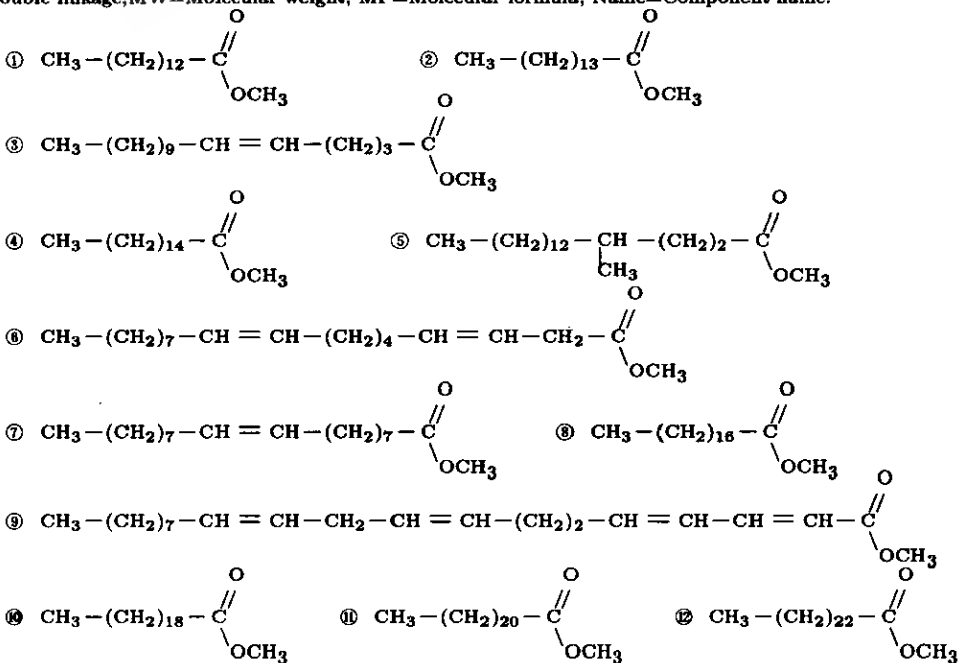
Fig. 3 The denarogram of chromatogram of fatty acids of spotted fever group rickettsiae by hierarchical clustering method (simple linkage)

表 3 西伯利亚立克次体 232 株脂肪酸甲酯气相色谱-质谱法分析结果

Table 3 Analytical result of *R. sibirica* 232 methylated fatty acids by GC-MS

RT(min)	MS			Mw	MF	成分名称 Name
	B ⁺	F ⁺	M ⁺			
26.024	74		242	242	①	十四烷酸甲酯 methyl myristate
28.563	71		255	256	②	十五烷酸甲酯 methyl pentadecanate
30.794	74		269	268	③	11-十六碳烯酸甲酯 methyl 11-hexadecenate
31.492	74		271	270	④	十六烷酸甲酯 methyl palmitate
33.700	71		283	284	⑤	14-甲基-十六烷酸甲酯 methyl 14-methyl-palmitate
35.456	81	123 220	295	294	⑥	9,15-十八碳二烯酸甲酯 methyl 9,15-octadecadienate
35.692	74	123	297	296	⑦	9-十八碳-烯酸甲酯 methyl 9-octadecienate
36.393	74		299	298	⑧	十八烷酸甲酯 methyl stearate
37.563	75		369	369	X	
39.126	79	119 150 203 220	319	318	⑨	9,12,16,18-二十碳四烯酸甲酯 9,12,16,18-arachidonate
40.834	74		327	326	⑩	二十烷酸甲酯 methyl arachidate
43.141	79		355	354	⑪	二十二烷酸甲酯 methyl behenate
45.178	149		356	356	X	
52.028	147		383	382	⑫	二十四烷酸甲酯 methyl tetracosanate

注： RT 保留时间； MS 质量数； B⁺ 基峰； M⁺ 母离子峰； F⁺ 双链断裂处； MW 分子量； MF 分子式。
Note: RT=Retention time; MS=Mass'number; B⁺=Base peak; M⁺=Mother ion peak; F⁺=Break site of Double linkage; MW=Molecular weight; MF=Molecular formula; Name=Component' name.



讨 论

气相色谱法分离能力强,可对微量样品进行定性定量分析,质谱法则有较强的鉴别能力,把色谱和质谱结合起来,不仅可以发挥两法的长处,弥补其不足,还可以取得两法中单独一法无法得到的数据。即用气相色谱从复杂的多组分混合物中分离出单组分后,逐一把单组分送入质谱计,用质谱法把这些组分进行定性鉴定,既发挥了色谱法的高分离能力,又发挥了质谱法的高鉴别能力,用电子计算机对数据进行处理和储存,相应地促进了色谱联用技术的发展。

通过本实验对 13 株斑点热群立克次体泛影葡胺纯化物脂肪酸成分的定性定量分析,可以看出所有菌株主要脂肪酸成分定性结果没有明显差别,定量分析结果则有明显差异。因此在聚类分析树状谱中表明中国分离株与西伯利亚立克次体相近,其中包括自新疆斑点热病人分离的 An-84 株、内蒙分离的 Se-85 株和 W-88 株三株自人体分离的菌株。不同地区来源菌株间的差别比不同宿主间的差别要明显。

另外值得提及的,康氏立克次体 Simko 株和西伯利亚立克次体较近,这在其它实验室的报告中也有专门讨论^[14]。其次,国际标准株西伯利亚立克次体 232(人株)和 246(蜱株)两株之间关系并非特别密切,其中 246 株与中国参考株 JH-74 株(蜱株)更为相近,是否与宿主不同有关,尚有待于进一步研究,至少在使用标准株对照时,应注意有所选择。

通过本试验,确定中国分离株为西伯利亚立克次体,其所致疾病为北亚蜱传斑点热。

参 考 文 献

- [1] 范明远等:中华卫生杂志, 9: 46—48, 1964.
- [2] Fan, M. Y. et al.: *J. Clin. Microbiol.*, 25:629—632, 1987.
- [3] Fan, M. Y. et al.: *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 36: 615—620, 1987.
- [4] 毕德增等:中华流行病学杂志, (11):221—225, 1990.
- [5] Winkler, H. H. and E. T. Miller: *J. Bact.*, 136:175—178, 1978.
- [6] Tsianabos, T. et al.: *J. Clin. Microbiol.*, 13: 603—605, 1981.
- [7] Zhou Fang and Z. W. Lu: *Kexue Tongbao*, 29: 688—692, 1984.
- [8] 汪民等:中华微生物和免疫学杂志 4: 295—298, 1984.
- [9] 俞树荣等:微生物学报, 27: 186—190, 1987.
- [10] 周 玲等:中国人兽共患病杂志, (7):6—8, 1991.
- [11] Hanson, B. A. et al.: *Infect. Immun.*, 34:596—600, 1981.
- [12] 周 方等:微生物学报, 30: 408—416, 1990.
- [13] 宋厚福等:微生物学报, 27: 306—317, 1987.
- [14] 李继祚等:立克次体、衣原体、弓形体专辑, 第 90—93 页, 中华流行病学杂志编辑部出版, 北京, 1983.

ANALYSIS OF FATTY ACID COMPOSITION OF SPOTTED FEVER GROUP RICKETTSIAE ISOLATED IN CHINA BY GAS CHROMATOGRAPHY

Zhou Ling Fan Mingyuan Chen Jianou Cai Hong

(Institute of Epidemiology and Microbiology, Chinese Academy of Preventive Medicine,
Beijing 102206)

Zhou Fang Zhu Houchu

(Institute of Microbiology and Epidemiology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071)

In present paper, fatty acid composition of seven Chinese isolates of SFG rickettsiae and six prototype strains of SFG rickettsiae were analyzed by GC-MS. Tested prototype strains of SFG rickettsiae were *R. sibirica* (strains 232 and 246), *R. conorii* (Simko), *R. rickettsi* (R), *R. akari* (Kaplan), *R. australis* (W58); Chinese isolates were An-84, Se-85, W-88 (human strain), MT-84, FT-84 (*D. nuttalli* strain), TO-85 (ova of *nuttalli*) and Chinese reference strain-JH-74 (*D. nuttalli*). They were propagated in yolk sacs of embryonated hen eggs and purified by centrifugation in a 30%—36%—42% discontinuous renografin density gradient. The fatty acid composition of selected strains of SFG rickettsiae was analyzed by gas chromatography, and then comparison being carried out by single linkage on mini-computer. Identification of the strains was performed based on the results obtained from GC-MS.

Results showed that the fatty acid profiles of all the isolates from China were quantitatively similar to that of *R. sibirica* and quite different from other prototype strains of SFG rickettsiae.

Key words Spotted fever group rickettsiae; *Rickettsia sibirica*; Fatty acid; Gas chromatography-Mass spectrography