

裂解气相色谱法鉴定八种杆菌*

周 方

(中国人民解放军军事医学科学院微生物流行病研究所,北京)

裂解气相色谱法是裂解法和气相色谱法的联用技术。方法是先将聚合物、生物大分子或微生物细胞等样品直接进行高温裂解,然后用气相色谱法分析一系列裂解碎片。这种方法的特点是快速、灵敏、准确,具有很强的特异性。它能和质谱、红外光谱、紫外光谱等分析手段联用,也能和计算机联用实现自动化。近十多年来,这种技术在医学生物学领域内得到了迅速发展^[1]。在国外有的已用于微生物的快速检出和鉴定以及疾病的快速诊断^[2];有的用于食品污染物中有害昆虫碎片的快速鉴定^[3]。近年来,我们利用国产仪器对 8 种杆菌、18 株类霍乱弧菌、3 株马鼻疽杆菌的补反抗原和 37 株类鼻疽补反抗原等样品进行了分类鉴定。本文主要报道利用居里点裂解气相色谱法对 8 种杆菌的初步鉴定结果。

材料和方法

1. 菌种: 经过常规鉴定的枯草芽孢杆菌、炭疽芽孢杆菌、蜡样芽孢杆菌、土拉杆菌、马鼻疽杆菌、类鼻疽杆菌、鼠疫杆菌和假结核杆菌等 8 种灭活的丙酮干燥菌粉。

2. 分析样品的制备: 取适量干燥菌粉置乳钵中研磨,加适量蒸馏水制成混悬液。用已称重的纯铁丝尖端部分沾取适量样品后,在热气流下吹干成膜,反复沾取样品 600—800 微克(干重),再准确称重。负载样品的铁丝置于硅胶干燥器内待用。

3. 实验仪器: 100 型气相色谱仪(上海分析仪器厂),30 瓦居里点裂解器(上海分析仪器厂),XWC-100 型 5 毫伏自动平衡记录仪(上海

自动化仪表二厂),SWK-4C 型数字温度程序控制仪(海城无线电厂)。火焰电离鉴定器。

4. 实验条件: 选用 100% 纯铁丝负载样品,裂解温度 770℃,裂解时间 12.5 秒。高纯氮气(北京氧气厂)为载气,流量为 15 毫升/分;高纯氢气(北京酿酒厂)流速为 30 毫升/分;氧气(北京氧气厂)流速为 300 毫升/分。色谱柱为长 2 米内径 4 毫米的 W 形不锈钢柱。填充物为 80—100 目 Porapak Q。柱炉开始的温度为 150℃。当样品裂解后,再以 4℃/分的速率上升至 200℃。每次分析大约需用 45 分钟。火焰电离鉴定器温度为 230℃。汽化器温度 240℃。放大器衰减位置为 1/4,灵敏度位置调至 1000,记录纸移动速度为 5 毫米/分。每种样品至少分析三次。

试验结果

一、分析方法的重复性

目测同一个枯草芽孢杆菌样品的三次裂解分析图谱(图 1—A、B、C),其图形轮廓和色谱峰之间的比例基本相同,由此说明,该分析法的重复性是好的。

二、裂解图谱特征的识别

在 8 种杆菌的裂解图谱中都标有 A、B、C、D 四个特征部分。A 为单个色谱峰,B、C、D 为峰群。每个菌种的裂解图谱都各有其特征“指纹”。

枯草芽孢杆菌的裂解图谱中最明显的特征为 A 峰,其高度比其它菌种裂解图中的相应峰

* 本实验菌种样品由古惠英等同志制备。并得到高树德主任和李俐副主任的指导。

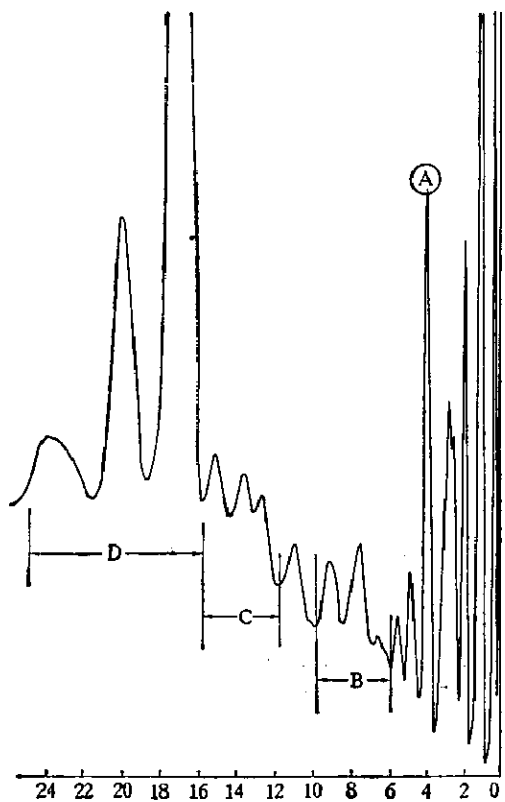


图 1-A

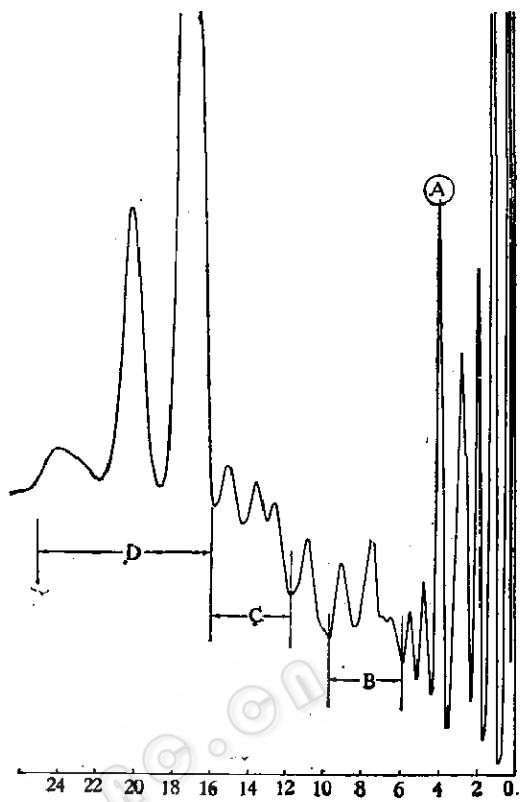


图 1-C

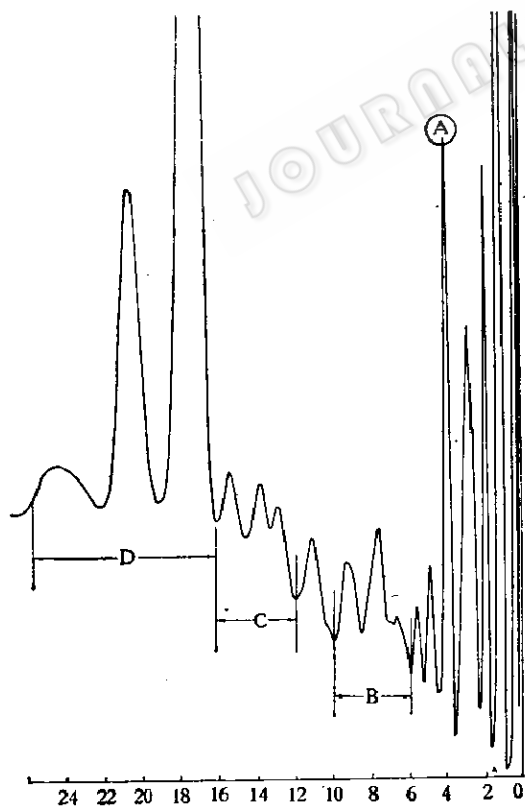


图 1-B

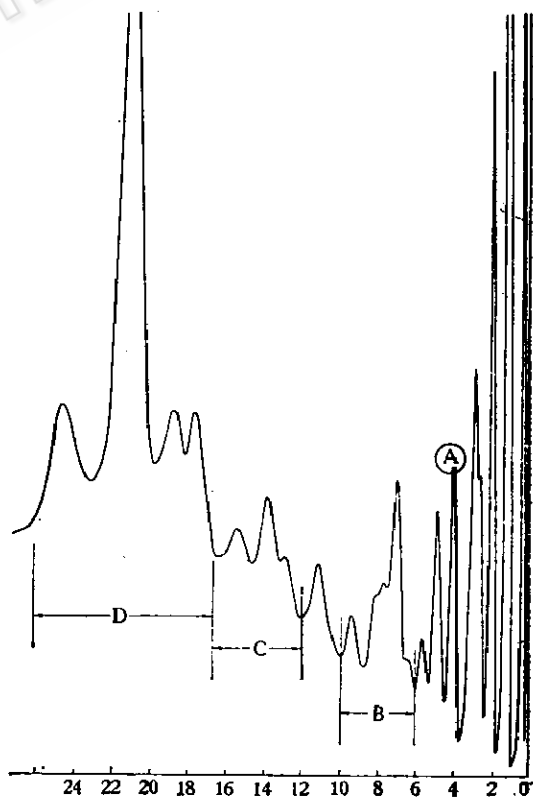


图 2

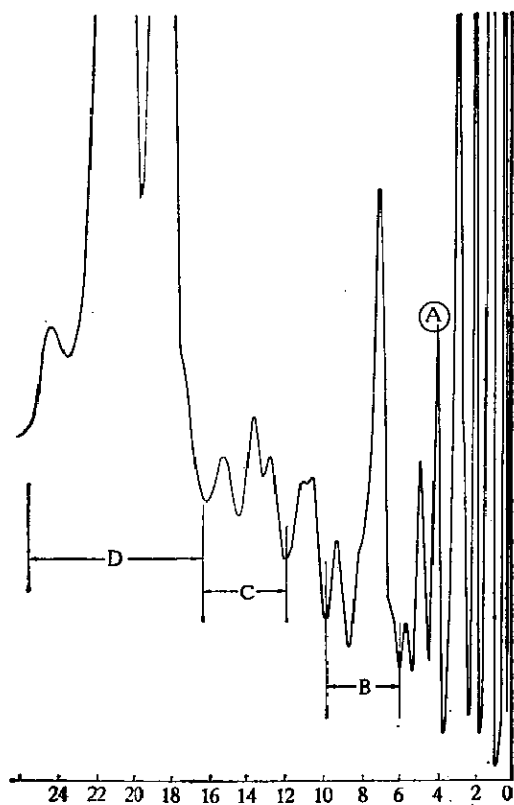


图 3

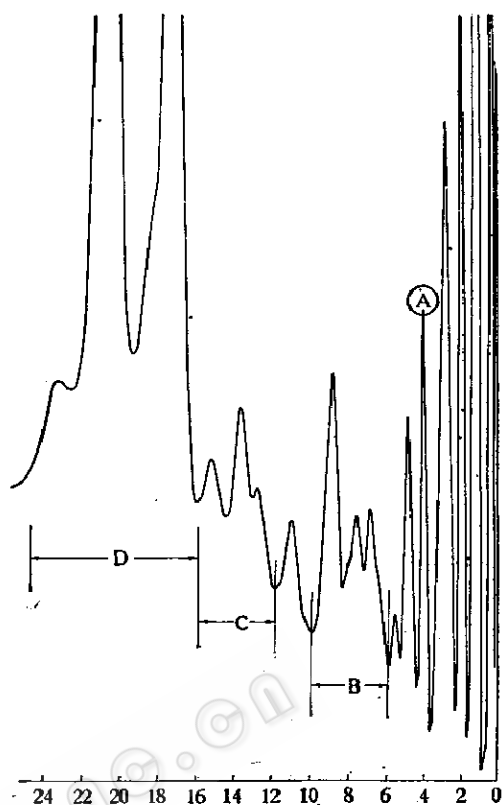


图 5

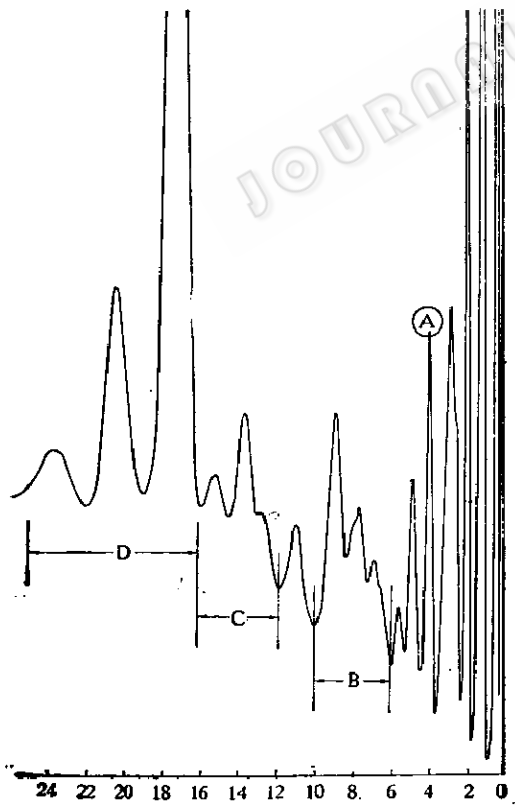


图 4

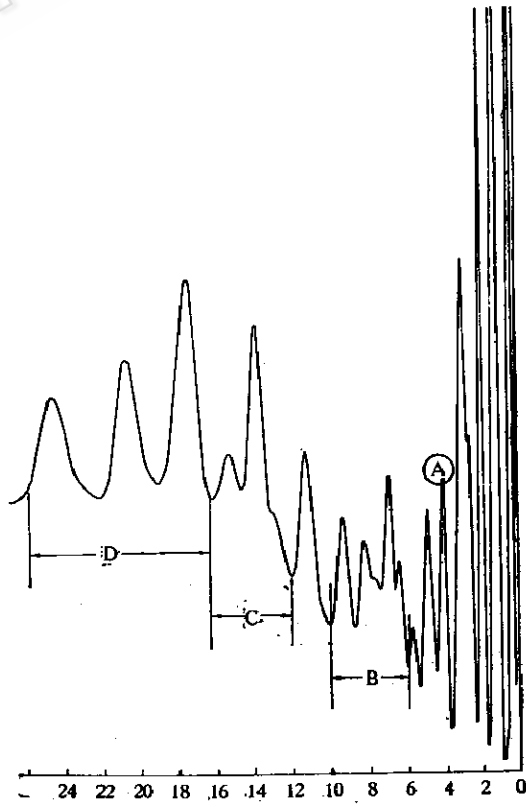


图 6

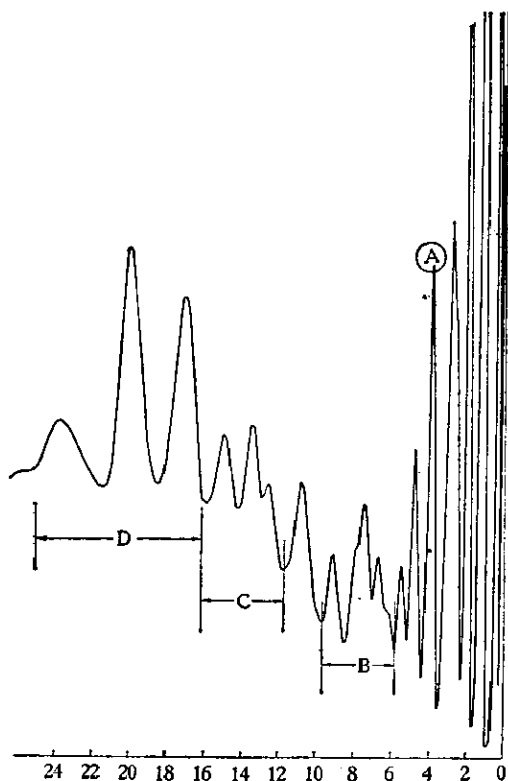


图 7

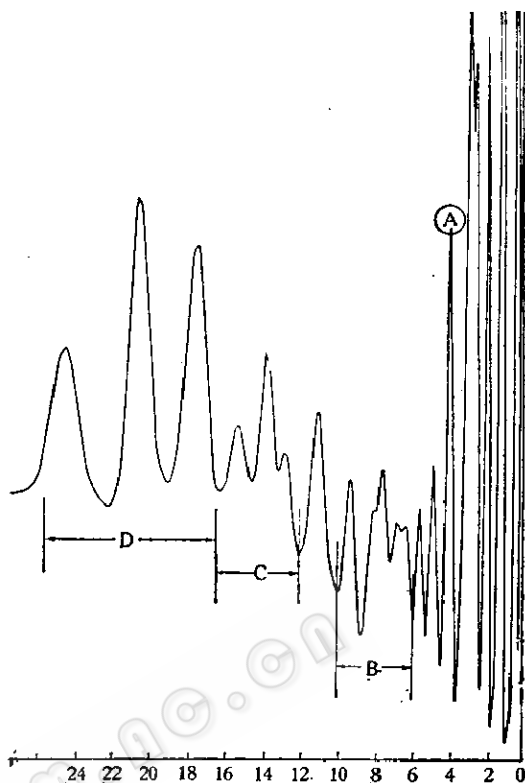


图 8

图 八种杆菌的裂解气相色谱

1A-1C: 枯草杆菌; 2: 马鼻疽杆菌; 3: 类鼻疽杆菌; 4: 炭疽芽孢杆菌; 5: 蜡样芽孢杆菌; 6: 土拉杆菌;
7: 鼠疫杆菌; 8: 假结核杆菌。横坐标: 保留时间(分);纵坐标: 记录器响应值(毫伏)。

都高, C峰群中的三个峰由右至左高度递增, B峰群中的三个峰右边峰最小。马鼻疽杆菌裂解图谱(图2)中, D峰群右边是一对等高的低矮双峰, 这是其主要区别特征。类鼻疽杆菌裂解图谱(图3)中, B峰群中出现特别突出的峰, 而D峰群中则缺少马鼻疽杆菌所具有的特征。炭疽芽孢杆菌裂解图谱(图4)中, D峰群的三个峰峰高递减, B峰群的三个峰峰高递增, 而蜡样芽孢杆菌裂解图谱(图5)中, B、D两个峰群区别于前者。土拉杆菌裂解图谱(图6)中, B峰群出现明显的四重峰, D峰群则是峰高递减的三个峰。鼠疫杆菌和假结核杆菌裂解图谱(图7、8)的图形轮廓很相似, 但通过C峰群的中间峰和D峰群的左侧峰可将二者分开。

讨 论

在本次试验前, 我们首先以粗制A型类毒

素为对象, 分别在下列范围内探索最佳实验条件。对9种色谱柱, 主要担体是上试101白色担体和 Chromosorb W; 固定相是 QF-1、SE-30、Carbowax 20M、OV-17、OV-210 和 Porapak Q 等; 5种不同裂解温度(770、660、610、420 和 358℃); 4种不同色谱柱的加热炉温度(100、130、150 和 170℃); 根据对裂解产物的分辨能力和流出成分的保留时间等方面进行综合考察。根据试验结果, 初步选用了以 Porapak Q (80—100目) 为填充物的长2米的W形不锈钢柱, 裂解温度为770℃, 裂解时间12.5秒。色谱柱炉温150℃, 恒温分离等最佳实验条件。由于程序升温既可增加色谱图中峰的数目, 又可缩短分析时间, 故选用了程序升温居里点裂解气相色谱法。

由选用的试验条件所得之结果看出, 用国产100型气相色谱仪配备程序升温控制仪和居

里点裂解器对 8 种杆菌进行区别鉴定是有可能的。但在现有条件下还不能明确鉴别出土拉杆菌的疫苗株和强毒株、炭疽芽孢杆菌的强毒株和无毒株、鼠疫杆菌和假结核杆菌的有荚膜和无荚膜以及 EL Tor 霍乱弧菌的血清型。这些尚待进一步摸索。

这套仪器本身灵敏度还不够高,单气路在程序升温时基线有漂移,但在实验室用于普通菌种的鉴定还是可以的。

参 考 文 献

- [1] Reinher, E.: The Role of Pyrolysis Gas Chromatography in Biomedical Studies, *Analytical Pyrolysis* (ed. by Jones, C. E. R. and C. A. Cramers), Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam, 1977, pp. 49—56.
- [2] Reiner, E. and F. L. Bayer: *J. Chromatogr. Sci.*, **16** (12):623—629, 1978.
- [3] Bennett, G. W. et al.: *Ann. Entomol. Soc. Amer.*, **66**(5):1123—1127, 1973.