

巴尔通体细胞脂肪酸成分分析

栗冬梅^{1Δ*} 苗志刚^{1,2Δ} 宋秀平¹ 王成岗^{1,3} 桑少伟¹ 刘起勇^{1*}

- (1. 中国疾病预防控制中心传染病预防控制所 传染病预防控制国家重点实验室 世界卫生组织媒介生物监测与管理合作中心 北京 102206)
(2. 苏州大学 神经科学研究所 江苏 苏州 215123)
(3. 山东中医药大学 基础医学院 山东 济南 250355)

摘要:【目的】分析影响巴尔通体脂肪酸成分的主要因素, 建立适合巴尔通体脂肪酸成分分析的标准化方法, 探讨脂肪酸图谱应用于巴尔通体分类鉴定的可能性。【方法】应用气相色谱技术分析不同培养条件下巴尔通体脂肪酸的组成与含量的变化; 应用已构建的标准化方法获取 10 株巴尔通体标准菌株和 9 株来自不同地区的汉赛巴尔通体猫分离株脂肪酸图谱; 应用 SPSS 16.0 统计软件对获得的数据资料进行聚类分析。【结果】培养基、温度和传代次数主要影响巴尔通体脂肪酸的微量成分; 10 株巴尔通体标准菌株的成分相似, 但也存在构成和含量上的差异; 在所测巴尔通体中, 检出可分辨脂肪酸成分有 20 种, 共有成分为 7 种, 其中 C_{18:1ω7c}、C_{18:0} 和 C_{16:0} 累积含量达 80% 以上; 猫分离株被准确鉴定为汉赛巴尔通体。【结论】巴尔通体脂肪酸成分受培养基、温度等培养条件影响, 在脂肪酸提取方法标化后, 可用于汉赛巴尔通体种水平分类鉴定。

关键词: 巴尔通体, 细胞脂肪酸, 气相色谱, 脂肪酸甲酯, 化学分类学, 猫抓病

基金项目: 国家“十二五”重大专项项目(No. 2011ZX10004-001)

*通讯作者: 刘起勇: Tel: 86-10-58900738; ✉: liuqiyong@icdc.cn

栗冬梅: Tel: 86-10-58900741; ✉: lidongmei@icdc.cn

△共同第一作者

收稿日期: 2013-05-28; 接受日期: 2013-07-26; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2013-08-15

Cellular fatty acids profiles of *Bartonella* species

LI Dong-Mei^{1Δ*} MIAO Zhi-Gang^{1,2Δ} SONG Xiu-Ping¹ WANG Cheng-Gang^{1,3}
SANG Shao-Wei¹ LIU Qi-Yong^{1*}

(1. Department of Vector Biology and Control, State Key Laboratory for Infectious Diseases Prevention and Control, WHO Collaborating Centre for Vector Surveillance and Management, National Institute for Communicable Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China)

(2. Institute of Neuroscience, Soochow University, Suzhou, Jiangsu 215123, China)

(3. College of Basic Medical Sciences, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan, Shandong 250355, China)

Abstract: [Objective] For establishing taxonomic relationships among *Bartonella* species, gas chromatography (GC) was utilized to investigate their cellular fatty acids (CFAs) compositions with particular attention on the different growth conditions in the qualitative and quantitative changes of CFAs. [Methods] The whole cellular fatty acid methyl esters (FAMES), from the different base media and the media at different percent of sheep blood, subculture and temperature of incubation, were obtained by saponification, methylation or extraction and then analyzed using the Sherlock Microbial Identification System. The dendrograms of ten strains of *Bartonella* species, isolated from different hosts (cats, dogs, rats, voles and human), and nine *Bartonella* strains of cats from different areas, were generated based on the CFAs data matrix using SPSS 16.0 software package. [Results] There were 20 CFAs in *Bartonella* strains tested. Among them, seven CFAs were common components and detected in all tested type strains of *Bartonella* species, which include C_{18:1ω7c}, C_{18:0} and C_{16:0} and account for more than 80% of the total CFAs. The rest were minor with their presence and relative contents of being affected significantly by differences of culture media and conditions. The dendrogram of the isolates from cats with different type strains was approximately consistent with the hierarchical structure of molecular phylogenetic systematics. [Conclusion] The CFAs profiles are obtained by carefully regulating and standardizing the growth conditions and these profiles are successfully used to identify *B. henselae* wild isolates. Although these CFAs profiles are very useful in terms of *Bartonella* taxonomy, they must be viewed with caution until our knowledge of the quantitative and qualitative distributions of fatty acids over a wide variety of taxa and the growth conditions.

Keywords: *Bartonella* species, Cellular fatty acids, Gas chromatography, Fatty acid methyl esters, Chemotaxonomy, Cat scratch disease

巴尔通体(*Bartonella* species)能够引起猫抓病(Cat scratch disease)、战壕热(Trench fever)和卡瑞恩病(Carrion's disease)等多种疾病,猫、犬及啮齿动物等哺乳类动物是其宿主,蚤、白蛉和体虱等吸血节肢动物是传播媒介。巴尔通体是一群革兰氏染色阴性、难于培养的兼性胞内寄生菌,由于其生长缓慢、生化反应不活泼,表型鉴定的方法不能应用

于巴尔通体的分类鉴定中。目前,多基因序列系统发育分析是鉴定巴尔通体的唯一标准^[1-3],进行新种鉴定时通常要发布该种或亚种的细胞脂肪酸(Cellular fatty acids, CFAs)组成成分。细菌的细胞壁脂肪酸含量和结构具有种属特征或与其分类位置密切相关,不同种属甚至不同型别具有不同的磷脂脂肪酸组成和含量水平,因此,是一类常见的生

物标记物^[4],是化学分类学中常用的方法之一。通过有机溶剂将细菌样品中的 CFAs 浸提出来,转化成脂肪酸甲酯(Fatty acid methyl ester, FAME),通过气相色谱(Gas chromatography, GC)等仪器分析,得到 CFAs 的种类和含量构成图谱(FAME 谱图),即可据此进行细菌的分类鉴定^[5]。微生物细胞 CFAs 组分会随着培养条件的变化而发生改变,CFAs 提取操作和色谱条件的差异都会直接影响结果,因此,分析过程的条件选择和质量控制非常重要,必须对培养基成分、培养条件、菌龄和色谱条件等实验条件进行标准化,否则会严重影响结果的准确度和重复性。目前虽已有商业化的微生物 FAME 气相色谱分析系统,且较为成熟的应用于细菌分类鉴定,但有关巴尔通体 CFAs 成分分析的研究报道较少^[6-8],尚未见系统地研究巴尔通体 CFAs 组成特征、影响因素及系统鉴定标准化方法的报道。本研究通过对培养时间、温度和传代次数等不同培养条件下巴尔通体 CFAs 构成变化的比较,探讨影响巴尔通体 CFAs 组成的主要因素,优化巴尔通体 CFAs 分析的操作方法,最终建立标准化的巴尔通体 CFAs 分类鉴定方法,并探讨 CFAs 分析能否应用于巴尔通体的分类鉴定。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

胰酶大豆肉汤(TSB)、哥伦比亚琼脂培养基(CBA)和胰酶大豆琼脂培养基(TSA),购于 BD (美国);昆虫细胞培养基 SIM,购于 Sigma (美国);标准胎牛血清(FCS),购于天津市灏洋生物制品科技有限责任公司;甲醇、甲基叔丁醚、正己烷、氢氧化钠和氯化钠,购于 Sigma (美国);浓盐酸购于北京化工厂。

1.2 主要仪器

371 型 CO₂ 培养箱(Thermo Scientific, 美国); HP6850 气相色谱仪(安捷伦, 美国); Sherlock 微生物鉴定系统(Sherlock MIS, MIDI 公司, 美国); 5804R 台式高速冷冻离心机(Sigma, 美国); HS-3

垂直混合器(宁波新芝生物科技股份有限公司); 恒温水浴槽(JULABO, 德国)。

1.3 实验菌株

10 株巴尔通体标准菌株(表 1)及分离自北京市、山东省和河南省的汉赛巴尔通体猫分离株 9 株。

1.4 培养方法

固体培养应用含 5% (10%)羊血的 TSA (CBA) 复苏培养巴尔通体菌株,培养条件为 5% CO₂、潮湿环境中 35 °C (37 °C)培养 4–6 d。液体培养应用 SIM 液体培养基参照文献[9]进行。

1.5 不同培养条件下 CFAs 成分差异比较

测定 Bh 在不同培养基(TSA、CBA 和 SIM)、不同培养温度(35 °C 和 37 °C)、不同血浓度(5%和 10%)和不同传代次数时的 CFAs 成分,分析 CFAs 含量影响因素,确定 CFAs 提取的标准培养条件。

1.6 菌体 FAMES 的提取

按照 MIDI Sherlock 微生物鉴定系统操作手册,应用 4 mm 接种环刮取 40 mg 培养物置于螺口玻璃试管底部,加 1 mL 溶液 I (NaOH 45 g, 甲醇 150 mL, 纯水 150 mL),拧紧螺盖,95–100 °C 沸水浴 5 min,取出振荡 5–10 s,再度拧紧螺盖,继续沸水浴 25 min;待样品管冷却后,加入 2 mL 溶液 II (6.0 mol/L HCl 325 mL, 甲醇 275 mL),盖严振荡,精确控制 80±1 °C 水浴 10 min,水浴冷却,此步骤需严格控制温度和时间,以免羧基酸和环式脂肪酸受到破坏;在冷却的样品管中加入 1.25 mL 溶液 III (200 mL 正己烷与 200 mL 乙醚混合均匀),快速振荡 10 min 左右,弃去下层水相;在剩余有机相中加入 3 mL 溶液 IV (NaOH 10.8 g, 纯水 900 mL)及几滴溶液 V (饱和 NaCl 溶液),快速振荡 5 min 左右,取 2/3 上层有机相置气相色谱样品瓶中备用。

1.7 气相色谱分析系统及色谱条件

FAMES 分析应用 HP6850 气相色谱仪,配备自动进样器,色谱条件参照 MIDI Sherlock 系统推荐方法设置。氢火焰离子化检测器(FID), 25 m Ultra-2 (HP 19091B-102)色谱柱,二级程序升温:起始温度 170 °C,

表 1 实验菌株
Table 1 The origins of the *Bartonella* tpye strains analyzed in the study

巴尔通体名称 <i>Bartonella</i> species	缩写 Abbrevia- tion	菌株名称 Strains name	菌种编号(来源) Collection No. (Source)	分离地 Geographic origin	宿主 Primary reservoir
汉赛巴尔通体 <i>B. henselae</i>	Bh	Houston-1	ATCC 49882 (人)	美国德克萨斯州	猫
五日热巴尔通体 <i>B. quintana</i>	Bq	Fuller	VR-358 (人)	前南斯拉夫	人
克氏巴尔通体 <i>B. clarridgeiae</i>	Bc	Houston-2 cat	51734 (猫)	美国德克萨斯州	猫
文森巴尔通体博格霍夫亚种 <i>B. vinsonii</i> subsp. <i>berkhoffii</i>	Bvb	NCSU 93-CO1	51672TM (犬)	美国北卡罗来纳州	犬
文森巴尔通体阿鲁潘亚种 <i>B. vinsonii</i> subsp. <i>arupensis</i>	Bva	OK 94-513	700727 (人)	美国怀俄明州	鼠
文森巴尔通体文森亚种 <i>B. vinsonii</i> subsp. <i>vinsonii</i>	Bvv	Baker	VR-152 (鼠)	加拿大魁北克	鼠
伊丽莎白巴尔通体 <i>B. elizabethae</i>	Be	F9251	49927 (人)	美国马萨诸塞州	鼠
格拉汉姆巴尔通体 <i>B. grahamii</i>	Bg	NCTC 12860	700132 (鼠)	英国	鼠
道志巴尔通体 <i>B. doshiae</i>	Bd	NCTC 12862	700133 (鼠)	英国	鼠
特利波契巴尔通体 <i>B. tribocorum</i>	Bt	IBS 506	CIP 105476 (鼠)	法国	鼠

每分钟升高 5–260 °C, 再以每分钟升高 40–310 °C, 维持 1.5 min; 进样口温度 250 °C, 载气为氢气, 流速 0.5 mL/min, 分流进样模式, 分流比 100:1, 进样量 2 µL; 检测器温度 300 °C, 氢气流速 30 mL/min, 空气流速 216 mL/min, 补充气(氮气)流速 30 mL/min。

1.8 数据分析

Sherlock 系统根据流出组分的等值碳链长度(ECL)值进行脂肪酸成分的定性, 并通过百分归一化进行各组分的相对定量。应用 SPSS 16.0 软件进行主成分分析和聚类分析。应用 MEGA 5.10 软件中邻接法(Neighbor-Joining, NJ)基于核苷酸 Kimura 2-parameter 模型构建系统发育树。

2 结果与分析

2.1 不同培养条件下 CFAs 成分差异比较

从图 1 中可以看出, 不同培养条件包括培养基、温度和传代次数主要影响 Bh 的 CFAs 微量成分, 对主要成分影响不大。

在 3 种不同培养基中, 应用 CBA 培养时 CFAs 成分变化较大, $C_{16:0}3OH$ 和 $C_{18:1\omega5c}$ 有缺失, $C_{11:0}ISO\ OH$ (8.4%)的含量明显高于其他两种培养基(图 1)。

培养基中羊血浓度的增加明显促进了 $C_{11:0}ISO\ 3OH$

和 $C_{17:0}$ 含量的增加; 浓度为 5%和 10%时, 分别缺失了 $C_{17:1\omega6c}$ 和 $C_{12:0}3OH$ 、 $C_{16:0}3OH$ 、 $C_{18:1\omega5c}$ (图 2)。

培养温度变化时, 微量成分中的 $C_{11:0}ISO\ 3OH$ 、 $C_{14:0}$ 、 $C_{16:1\omega7c}$ 、 $C_{17:0}$ 、 $C_{18:1\omega9c}$ 和 $C_{18:2\omega6,9c}$ 在 37 °C 培养时有所减少, 且只影响了各 CFAs 的含量, 组成成分没有变化(图 3)。

传代次数的增加, 使得主要成分中 $C_{18:1\omega7c}$ 含量逐渐减少, $C_{18:0}$ 含量逐渐增加; 微量成分中, $C_{11:0}ISO\ 3OH$ 、 $C_{16:1\omega7c}$ 、 $C_{17:0}$ 、 $C_{18:2\omega6,9c}$ 和 $C_{18:1\omega5c}$ 的含量在传代过程中逐渐减少(图 4)。

2.2 巴尔通体标准菌株 CFAs 组成

经上述 CFAs 成分的影响因素分析, 确定标准培养条件为 35 °C、含 5%羊血 TSA 培养基, 培养 4–6 d 提取 CFAs, 测定 10 株巴尔通体标准菌株的 CFAs。经 GC 检测和分析, 10 株巴尔通体标准菌株具有特征性 FAME 图谱(图 5), 能够直接辨识; 全部菌株中共检出 20 种不同的 CFAs 成分, 其中所有巴尔通体均检测出的成分有 7 种, 占总量的 90%以上(表 2); 其中 $C_{18:1\omega7c}$ (47%–63%)、 $C_{18:0}$ (7%–22%)和 $C_{16:0}$ (13%–31%)占绝对优势, 含量达 80%以上, 后两种脂肪酸含量在不同种间差别较大。

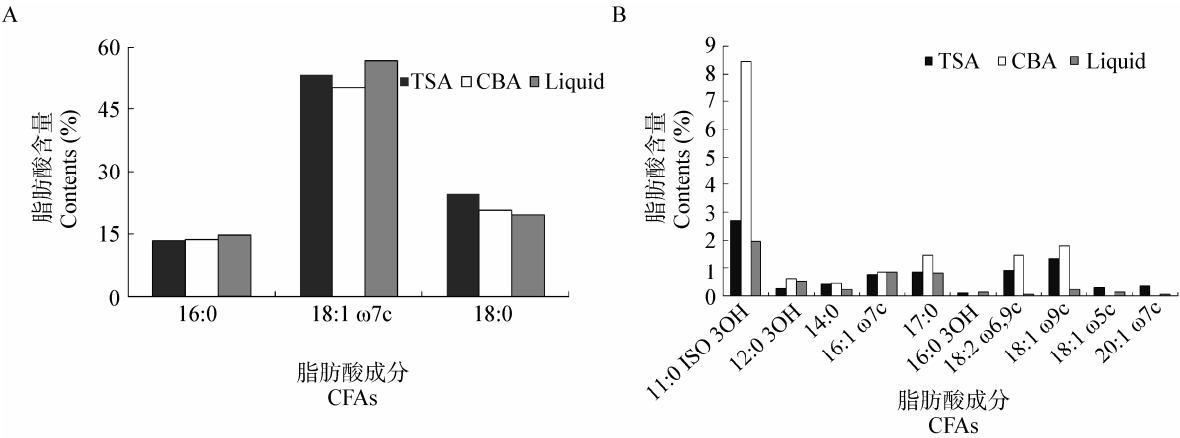


图 1 不同培养基对汉赛巴尔通体脂肪酸成分的影响

Figure 1 Comparison of the effects of different medium on CFAs of *B. henselae*

注：A：主要成分；B：微量成分.

Note: A: Major contents of CFAs; B: Minor contents of CFAs.

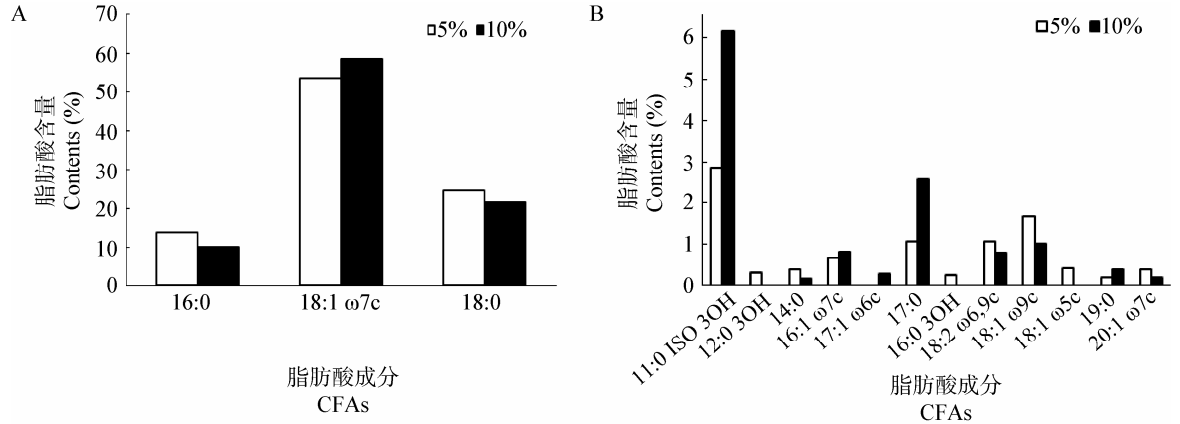


图 2 培养基中不同羊血浓度对汉赛巴尔通体脂肪酸成分的影响

Figure 2 Comparison of the effects of different concentration of blood in the medium on CFAs of *B. henselae*

注：A：主要成分；B：微量成分.

Note: A: Major contents of CFAs; B: Minor contents of CFAs.

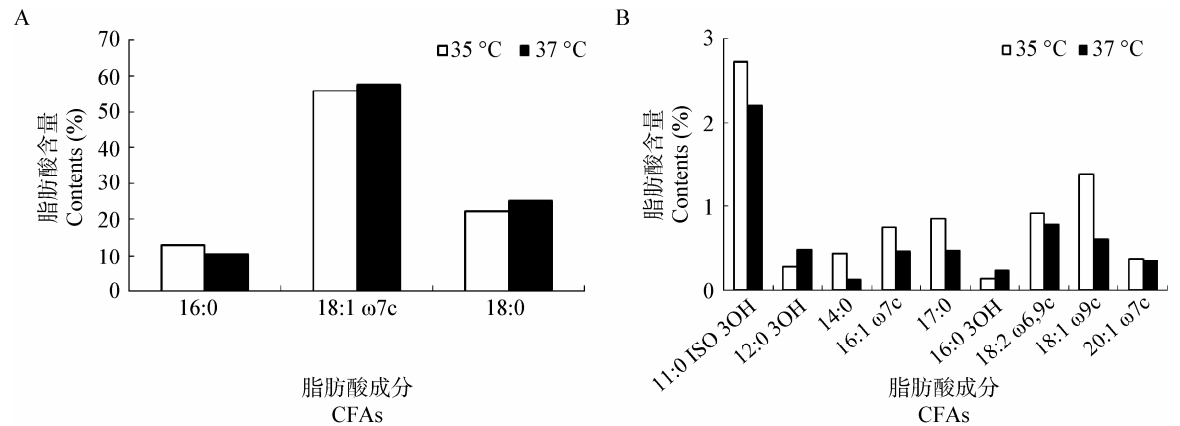


图 3 不同培养温度对汉赛巴尔通体脂肪酸成分的影响

Figure 3 Comparison of the effects of different temperature of culture on CFAs of *B. henselae*

注：A：主要成分；B：微量成分.

Note: A: Major contents of CFAs; B: Minor contents of CFAs.

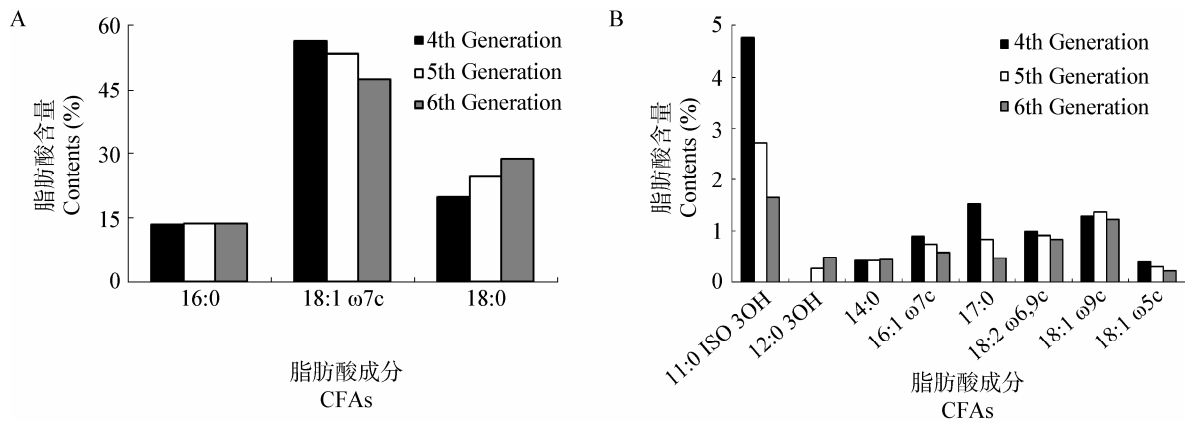


图 4 传代次数对汉赛巴尔通体脂肪酸成分的影响
Figure 4 Comparison of the effects of subculture on CFAs of *B. henselae*
注：A：主要成分；B：微量成分.
Note: A: Major contents of CFAs; B: Minor contents of CFAs.

表 2 巴尔通体标准菌株脂肪酸组成										
Table 2 The Compositions of cellular fatty acids of the types of <i>Bartonella</i> species										
脂肪酸 CFAs (%)	巴尔通体菌株 <i>Bartonella</i> species									
	Bh	Bg	Be	Bq	Bd	Bt	Bc	Bva	Bvb	Bvv
C _{18:1} ω _{7c}	55.960	54.910	51.400	55.880	60.660	46.970	55.020	47.900	63.230	53.540
C _{18:0}	22.400	21.280	11.570	12.010	7.700	12.120	17.100	10.460	7.500	8.780
C _{16:0}	13.180	14.270	28.560	26.460	18.430	30.910	14.080	23.880	20.990	23.730
C _{11:0} ISO OH	2.710	4.260	1.970	2.270	3.650	2.980	3.300	5.180	3.150	1.060
C _{16:1} ω _{7c}	0.740	0.890	2.020	1.210	2.130	1.800	0.970	1.580	2.540	1.920
C _{18:2} ω _{6,9c}	0.915	1.180	0.530	0.490	0.290	0.520	1.550	0.880	0.620	0.750
C _{14:0}	0.430	0.160	0.790	0.480	0.340	0.670	0.340	0.520	0.390	0.530
C _{12:1} 3OH	ND	ND	0.280	0.470	0.620	0.340	0.830	ND	0.260	0.330
C _{12:0} 3OH	0.270	ND	0.440	0.240	0.530	0.580	0.710	0.380	ND	0.340
C _{17:0}	0.850	0.910	1.030	ND	3.310	0.220	0.850	3.990	ND	6.170
C _{16:0} 3OH	0.130	0.320	0.180	0.170	ND	0.440	0.480	ND	ND	0.350
C _{18:1} ω _{9c}	1.370	1.190	0.930	ND	ND	0.720	1.660	1.560	ND	0.680
C _{18:1} ω _{5c}	0.310	ND	ND	ND	0.430	0.190	0.440	0.500	0.360	0.350
C _{17:1} ω _{6c}	ND	ND	0.190	ND	1.090	ND	0.390	0.800	ND	1.130
Anteiso-C _{14:0}	0.095	0.130	ND	0.100	ND	ND	0.200	ND	ND	ND
Anteiso-C _{17:0}	0.160	0.330	ND	ND	ND	ND	0.210	ND	ND	ND
C _{17:1} ω _{8c}	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.150
C _{18:3} ω _{6c} (6,9,12)	ND	ND	ND	ND	ND	0.180	0.080	0.350	ND	ND
C _{19:1} ω _{6c}	ND	ND	ND	ND	ND	0.460	ND	0.840	ND	ND
C _{14:1} ω _{5c}	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.190	ND	ND
C _{20:1} ω _{7c}	0.280	0.110	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

注：ND：未检出。
Note: ND: Not detected.

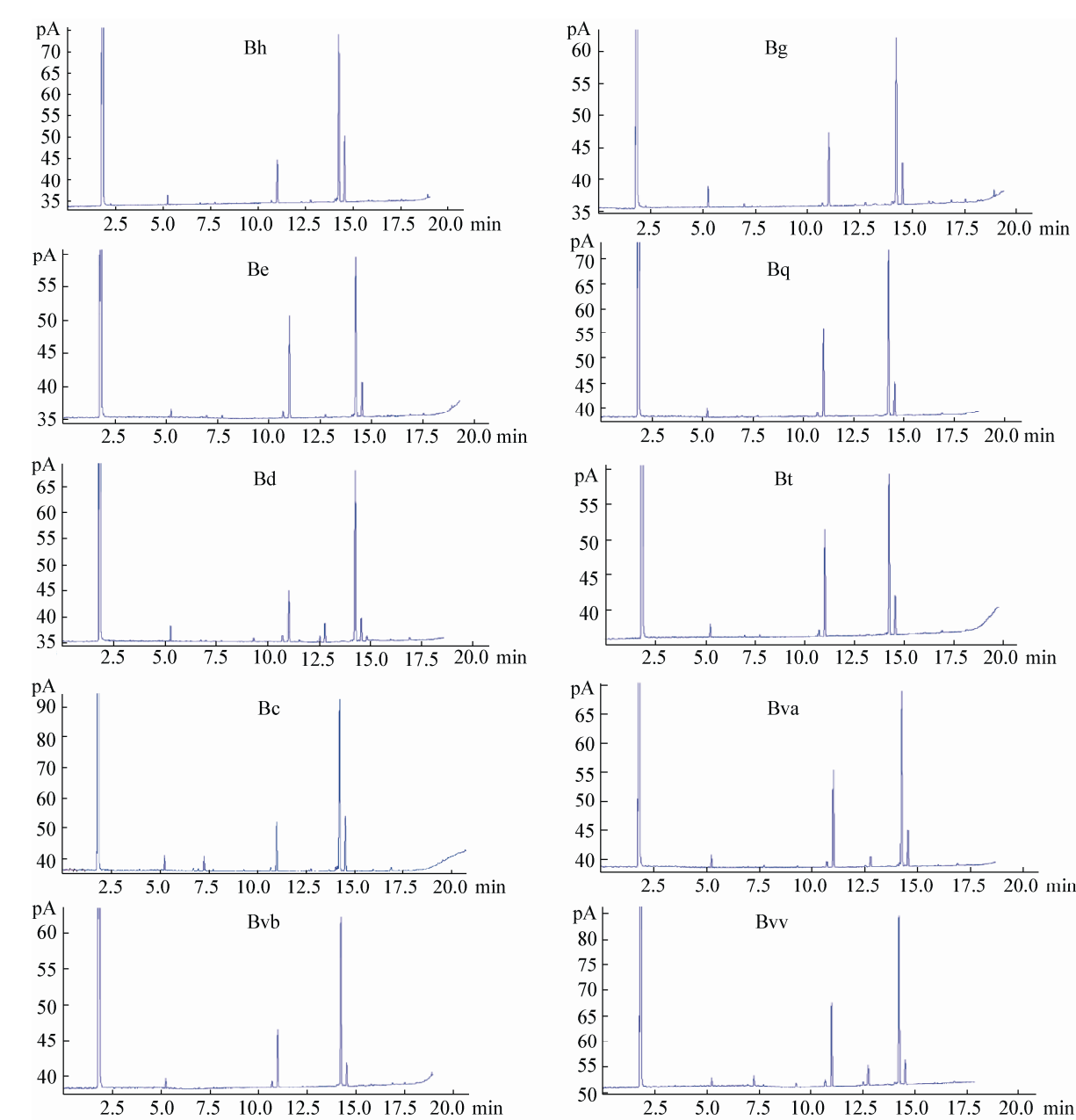


图 5 巴尔通体标准菌株脂肪酸甲酯气相色谱图

Figure 5 Gas chromatogram of methylated fatty acids of the type strains of *Bartonella* species

注：横坐标表示色谱分析时间(min)，纵坐标表示色谱峰高值。第一个色谱峰为溶剂波峰。

Note: Abscissa represents analyzing time of chromatogram and ordinate shows height of chromatogram peak. The solvent peak is the first.

2.3 脂肪酸分析在野生菌株鉴定中的应用

本实验所用到的 9 株猫分离株经过核酸序列分析鉴定为 Bh (图 6)，应用已建立的标准培养体系将这些菌株复苏后培养至第 3 代提取 CFAs，进

行 GC 检测与分析。将猫分离株与所有标准菌株应用欧式距离(Euclidean distance)下的类平均法(Average linkage between groups)进行系统聚类分析，所得聚类如图 7A 所示，Bh、Bg 和 Bc 没有区

别开而聚到一起,一株猫分离株没有聚到 Bh 分支,显示明显的分类错误。经初步分析发现部分变量(表 2 中 CFAs)之间有明显相关性,因此本研究采用主成分分析将变量拟合出 7 个主成分(累积贡献率 91.4%),再同法进行聚类分析显示猫分离株全部与 Bh 聚在一起,与其它 9 种巴尔通体分离开来,鉴定准确率达到了 100%,具有种水平鉴定能力(图 7B)。

3 讨论

细菌的 CFAs 主要来自于细胞膜上的磷脂双分子层,在细胞合成 CFAs 时会受到很多因素影响,如培养条件和细菌细胞的自身生长状态,不同培养条件和菌体收获时的状态都会影响 CFAs 的组成和含量,因此,在测定细菌 CFAs 时要考虑这些影响因素,提取时要进行严格的质量控制,特别是应用于菌株分类鉴定时,应统一条件,按照标准化程序

操作,以使结果有可比性而避免对结果的错判。本研究发现培养基、温度和传代次数等培养条件能够影响巴尔通体 CFAs 组成和含量,特别是对微量成分的影响较为明显。为了得到一致的结果,将未知菌株的 FAME 图谱用于比较鉴定,使之在特殊培养基及温度下生长是至关重要的。在勿使 CFAs 丢失的情况下,综合实验条件和操作习惯等因素考虑,确定了标准的巴尔通体 CFAs 提取培养方法:依据 TSA 和 CBA 的比较结果、MIDI 操作手册和实验室常规方法确定培养基应用 TSA,添加羊血浓度为常规工作浓度 5%,35 °C (分离培养时的实验室常规温度)复苏后第 3 代(第 2 代时生长欠佳),依据不同巴尔通体不同对数生长期^[9],选择 4–6 d 收获菌株。生长极缓慢的,如杆菌样巴尔通体(*B. bacilliformis*)和克勒巴尔通体(*B. koehlerae*)应适当延长时间。

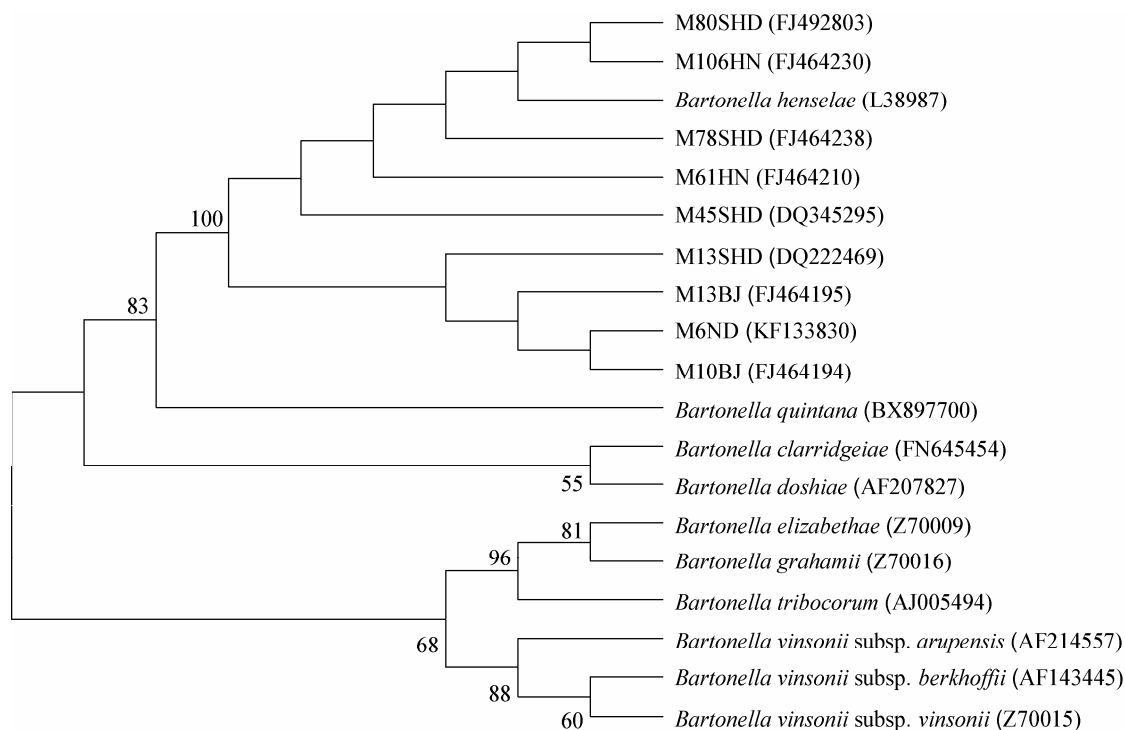


图 6 基于 *gltA* 序列(275 bp)用邻接法构建的系统发育树

Figure 6 Phylogenetic tree based on the 275 bp sequence of *gltA* for *Bartnella* strains and drawn using the Neighbor-Joining method

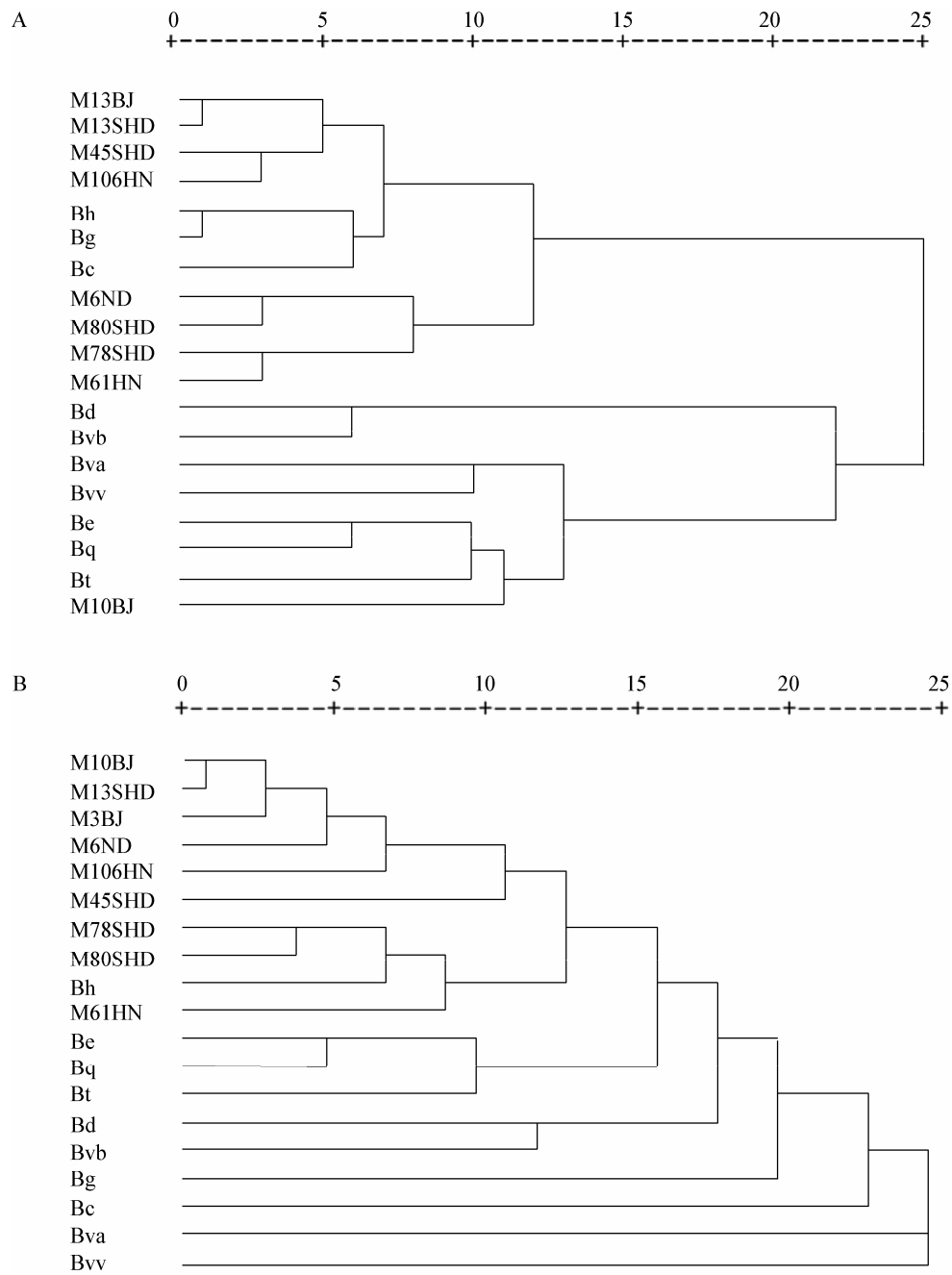


图 7 猫汉赛巴尔通体分离株与巴尔通体标准菌株基于细胞脂肪酸成分的聚类分析图

Figure 7 Dendrogram of *B. henselae* isolates from cats and the type strains of *Bartonella* species based on the cellular fatty acids components

注：A：未经主成分分析的聚类图；B：由 7 种主成分作为变量绘制的聚类图。

Note: A: Dendrogram without the principal component analysis; B: Dendrogram plotted by 7 principal components as the variables.

本研究检测了 10 株巴尔通体标准菌株的 CFAs，主要成分的构成与文献报道(表 3)的大致相当，具体含量上的差异与应用的培养条件、提取方

法、检测方法和仪器不同有关。 $C_{18:1\omega7c}$ 、 $C_{18:0}$ 和 $C_{16:0}$ 是 3 种最主要的成分，含量在 80%以上，这也是大多数微生物 CFAs 生物标记的分布特

表 3 文献报道的巴尔通体菌株脂肪酸组成
Table 3 The Compositions of cellular fatty acids of *Bartonella* species in references

脂肪酸 CFAs (%)	巴尔通体菌株 <i>Bartonella</i> species								
	Bh ^[10-11]	Bc ^[12]	Bq ^[7,13]	<i>B. weissii</i> ^[14]	Bva ^[15]	Bvb ^[16]	Bvv ^[7]	<i>B. schoenbuchii</i> ^[17]	Bb ^[7,18]
C _{18:1ω7c}	35.0–50.0	57.5	39.5–58.0	45.0–66.0	50	51	45	42.4–49.9	0–35.0
C _{18:0}	5.0–24.0	22.6	16.0–35.0	12.0–23.0	16	16	9	34.4–37.0	7.0–29.0
C _{16:0}	5.0–9.0	12.3	20.0–27.5	13.0–20.0	13	20	18	11.8–16.0	20.0–25.0
C _{17:0}	15	2.6	–	–	9	8	13	0–0.5	–
C _{16:1ω7c}	16	–	<1	–	–	1	2	–	18
C _{18:1ω9c}	–	1.4	<1–1.2	–	–	–	–	–	2.0–30.0

征^[4]。巴尔通体各个种的主要成分存在含量上的差异,微量成分有构成的不同,通过色谱图基本可以直接分辨,这些 CFAs 的不同构成与含量差异成为种间分类的基础。

从标准菌株的聚类分析看,CFAs 不能如核酸序列分析一样反映出种间的亲缘关系变化,如文森巴尔通体的 3 个亚种及鼠传巴尔通体的聚集,在 CFAs 聚类图中都不能显示出来,说明不同宿主来源的巴尔通体的 CFAs 组成没有特征性的变化。对于野生猫株的鉴定与核酸序列分析结果是一致的,初步推论 CFAs 检测能够用于汉赛巴尔通体种水平的分类鉴定,对于其他宿主如鼠、犬、猴等来源的菌株的鉴定,需要进一步的实验验证。

从数据分析的过程可以看出,由于 CFAs 成分之间有相关性,使得直接利用原始数据进行聚类分析时,不同种巴尔通体(如 Bh、Bg 和 Bc)不能被分开而导致错误分类。应用主成分分析法将 CFAs 组成变量降维处理后得到了正确的分类关系,因此,CFAs 应用于巴尔通体分类时,有必要对原始数据进行统计学处理。基于气相色谱的 CFAs 检测操作简单快速,现今的快速气相色谱比本研究中应用的标准气相色谱还要快 10 倍,若作为巴尔通体化学分类鉴定方法的补充,可大大提高检测速度,也可为全面认识巴尔通体提供更多数据信息。

致谢:感谢中国疾病预防控制中心传染病预防控制所鼠疫室海荣老师、张志凯在实验过程中给予的支持和帮助。感谢军事医学科学院微生物流行病学研究所谭亚芳博士给予的指导和帮助。

参 考 文 献

[1] Paziewska A, Harris PD, Zwolinska L, et al. Recombination within and between species of the alpha proteobacterium *Bartonella* infecting rodents[J]. Microbial Ecology, 2011, 61(1): 134-145.

[2] Hanage WP, Fraser C, Spratt BG. Fuzzy species among recombinogenic bacteria[J]. BMC Biology, 2005, 3: 6.

[3] Cohan FM. What are bacterial species?[J]. Annual Review of Microbiology, 2002, 56: 457-487.

[4] 刘波. 微生物脂肪酸生态学[M]. 北京: 中国农业科学技术出版, 2011: 8, 151.

[5] 王秋红, 蓝江林, 朱育菁, 等. 脂肪酸甲酯谱图分析方法及其在微生物学领域的应用[J]. 福建农业学报, 2007, 22(2): 213-218.

[6] Westfall HN, Edman DC, Weiss E. Analysis of fatty acids of the genus *Rochalimaea* by electron capture gas chromatography: detection of nonanoic acid[J]. Journal of Clinical Microbiology, 1984, 19(3): 305-310.

[7] Welch DF, Pickett DA, Slater LN, et al. *Rochalimaea henselae* sp. nov., a cause of septicemia, bacillary angiomatosis, and parenchymal bacillary peliosis[J]. Journal of Clinical Microbiology, 1992, 30(2): 275-280.

[8] Kordick DL, Swaminathan B, Greene CE, et al. *Bartonella vinsonii* subsp. *berkhoffii* subsp. nov., isolated from dogs; *Bartonella vinsonii* subsp. *vinsonii*; and emended description of *Bartonella vinsonii*[J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 1996, 46(3): 704-709.

[9] 栗冬梅, 苗志刚, 宋秀平, 等. 巴尔通体液体培养条件简化及生长曲线观察[J]. 微生物学通报, 2012, 39(11): 1-8.

[10] Wayne C, Moss G, Holzer PL, et al. Cellular fatty acid compositions of an unidentified organism and a bacterium associated with cat scratch disease[J]. Journal of Clinical Microbiology, 1990, 28(5): 1071-1074.

- [11] Ulrich Z, Buko L, Yuriy AK, et al. Structure and biological activity of the short-chain lipopolysaccharide from *Bartonella henselae* ATCC 49882T[J]. Journal of Biological Chemistry, 2004, 279(20): 21046-21054.
- [12] 栗冬梅, 刘起勇, 宋秀平, 等. 中国猫克氏巴尔通体分离株生物学及分子特征分析[J]. 微生物学报, 2009, 49(4): 429-437.
- [13] Alessandra C, Andrea P, Simonetta C, et al. Molecular characterization of first human *Bartonella* strain isolated in Italy[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2001, 39(12): 4554-4557.
- [14] Chang CC, Chomel BB, Kasten RW, et al. *Bartonella* spp. isolated from wild and domestic ruminants in North America[J]. Emerging Infectious Diseases, 2000, 6(3): 306-311.
- [15] Welch DF, Carroll KC, Hofmeister EK, et al. Isolation of a new subspecies, *Bartonella vinsonii* subsp. *arupensis*, from a cattle rancher: identity with isolates found in conjunction with *Borrelia burgdorferi* and *Babesia microti* among naturally infected mice[J]. Journal of Clinical Microbiology, 1999, 37(8): 2598-2601.
- [16] Breitschwerdt EB, Kordick DL, Malarkey DE, et al. Endocarditis in a dog due to infection with a novel *Bartonella* subspecies[J]. Journal of Clinical Microbiology, 1995, 33(1): 154-160.
- [17] Dehio C, Lanz C, Pohl R, et al. *Bartonella schoenbuchii* sp. nov., isolated from the blood of wild roe deer[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2001, 51: 1557-1565.
- [18] Clay J, Cockerella P, Tierno M, et al. Clinical, histologic, microbiologic, and biochemical characterization of the causative agent of bacillary (epithelioid) angiomatosis: a rickettsial illness with features of *Bartonellosis*[J]. The Journal of Investigative Dermatology, 1991, 97(5): 812-817.



稿件书写规范

高校教改纵横栏目简介及撰稿要求

“高校教改纵横”栏目，是中国微生物学会主办的科技期刊中唯一的教学类栏目，也是中国自然科学核心期刊中为数不多的教学栏目。该栏目专为微生物学及其相关学科领域高校教师开辟，一方面为高校微生物学学科的教师提供一个发表论文的平台，同时微生物关联学科的一部分确实优秀的论文也可以在此发表，是微生物学及相关领域教学研究、交流、提高的园地。

本栏目的文章有别于其他实验类研究报告，特色非常鲜明。要求作者来自教学第一线，撰写的稿件内容必须要有新意、要实用，不是泛泛地叙述教学设计与过程，而是确实有感而发，是教学工作中的创新体会，或者在教学中碰到的值得商榷的、可以与同行讨论的有价值的论题。在内容选材上应该有鲜明的特点和针对性，做到主题明确、重点突出、层次分明、语言流畅。教师的教学思路应与时俱进，注意将国内外新的科技成果和教学理念贯穿到教学之中，只有这样才能真正起到教与学的互动，促进高校生物学教学的发展，更多更好地培养出国家需要的高科技创新人才。这也是本栏目的目的所在。

同时，为了给全国生物学领域的教学工作者提供一个更广阔更高层次的交流平台，本栏目还开辟了“名课讲堂”版块，邀约相关生命科学领域，如微生物学、分子生物学、生物医学、传染病学、环境科学等的教学名师、知名科学家就教学和学生培养发表观点，推荐在教学改革、教学研究、引进先进教学手段或模式以及学生能力培养等方面有突出成绩的优秀论文，为高校教师以及硕士、博士研究生导师提供一个可资交流和学习的平台，促进高校教学和人才培养水平的提高。

欢迎投稿！欢迎对本栏目多提宝贵意见！