

磷酸类脂快速测定方法

阮继生

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

摘要：磷酸类脂快速测定经修订和多年试用验证，方法简单快速，试验结果可靠。

关键词：磷酸类脂，快速测定

中图分类号：Q93 文献标识码：A 文章编号：0253-2654 (2006) 04-0190-03

磷酸类脂位于细菌和放线菌细胞膜上，属于极性脂。不同属菌的磷酸类脂组分是不同的，它是鉴别属的重要特征之一，是化学分类项目中不可缺少的分类指征。磷酸类脂的种类繁多，但用于分类的指征并不多。Lechevalier (1980) 分析了 48 个属好气放线菌，用于分类指征的磷酸类脂只有 5 种：(1) 磷脂酰乙醇胺 (PE phosphatidyl ethanolamine)；(2) 磷脂酰甲基乙醇胺 (PME phosphatidyl methyl ethanolamine)；(3) 磷脂酰胆碱 (PC phosphatidyl choline)；(4) 磷脂酰甘油 (PG phosphatidyl glycerol)；(5) 含葡萄糖胺未知结构的磷酸类脂 (GluNu phospholipids of unknown structure containing glucosamine)。

根据上述 5 种磷酸类脂组成 5 种磷酸类脂型见表 1，点样示范见图 1。

表 1 好气放线菌的磷酸类脂型

型	特征性的磷酸类脂				
	PE	PME	PC	GluNu	PG
PI	—	—	—	—	✓
PII	+	—	—	—	—
PIII	✓	✓	+	—	✓
PIV	✓	✓	—	+	—
PV	—	—	—	+	+

注：— 不存在，+ 存在，✓ 有变化

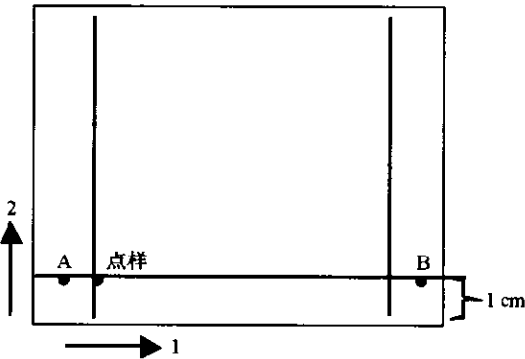


图 1 点样示范图

作者曾在《放线菌研究及应用》一书的第四章中对磷酸类脂在分类中的作用做了详细介绍，其内容与方法可行的。但由于磷酸类脂的粗提与精制需要制备几十克干菌体。英国 Minnikin 与德国 Kroppenstedt 等使用薄板双相层析方法鉴别，只用 100mg 干菌体就可提取出磷酸类脂与醌的两种测试样品。此法经我们修订后，方法简捷。用 1 块或 4 块层析板，不加或加标准品均可，经多年的试用验证，可获得理想试验结果。

1 快速鉴别方法

1.1 菌种培养 将测试菌接种于培养液 (1% 酵母浸汁、1% 葡萄糖、pH7.2) 或其他

板显色：第 1 块板先用茚三酮试剂喷湿，于 110℃ 保温 5 ~ 10min，带游离氨基的磷脂如 PE、PME 会出现红色至紫色，但 PC 不与茚三酮有反应。用铅笔轻轻描出斑点位置（在板上描），然后继续加热至 140℃ 保温 15min。这时，含糖的磷酸类脂如 PI、PIMS 或 NPG (GL) 就会出现黄至浅红斑点，这些磷酸类脂的 R_f 值比 PE、PME 低，也用铅笔描出位置。最后用 Dittmer and lester 磷酸试剂将 TLC 板喷湿，所有的磷酸类脂呈兰色。与模式图 3 及表 1 结果对比得知测试菌所含有的磷酸类脂成分及磷酸类脂型。

另外 3 块板用来进一步验证第 1 块板的结果。用 Dragendoff 试剂喷第 2 块板，PC、PE、PME 及 lyso 型结构，在黄色背景上出现橘黄色点。用 Schiff 试剂喷第 3 块板，OH 基的磷酸类脂及 PG 呈粉红或紫色，PI 为褐色。用 α -Naphthol 试剂喷第 4 块板，110℃ 加热 10min，NPG (GL)、PIDM 呈褐色。综合上述 4 块板的分析结果，则可明确测试菌所含有的磷酸类脂的组成及型。

2 结果

模式见图 3。

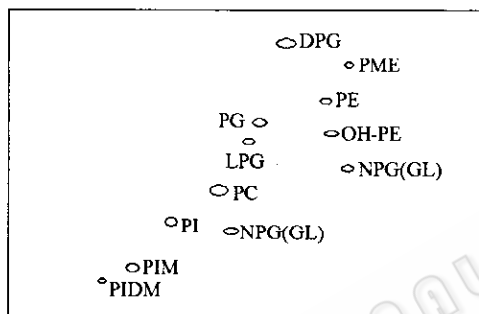


图 3 磷酸类脂模式图

磷酸类脂位置是经过标准品验证及大量菌株实验结果而得。

LPG: lyso - phosphatidyl glycerol, NPG: phosphatidyl-N-acetylglucosamine, (Glu Nu); glycolipids (GL), PIM: phosphatidylinositol mannoside, PI: phosphatidylinositol, PIDM: phosphatidylinositol dimannoside。

附录 * 磷酸类脂显色剂：

(1) 茚三酮试剂：茚三酮 0.4g，溶于水饱和正丁醇 100mL 中（或者 0.1g 茚三酮溶于 100mL 丙酮中）。

(2) 磷酸试剂（Dittmer and lester 试剂）：溶液 A：三氧化钼 40.11g 溶于 1,000mL 25mol/L H_2SO_4 中煮沸溶解。溶液 B：钼粉 1.78g，溶于 500mL 溶液 A 中煮沸 15min，冷却后弃残余物。磷酸试剂：溶液 A 10mL + 溶液 B 10mL + 20mL 蒸馏水。

(3) Dragendoff 试剂：溶液 A：次硝酸铋 1.7g 溶于 20% 冰醋酸 100mL 中，溶液 B：碘化钾 40g 溶于 100mL 蒸馏水中。

3.5mL 溶液 A + 5mL 溶液 B + 20mL 冰醋酸 + 50mL 蒸馏水（依次序加）即可。

(4) Schiff 试剂：A：使二氧化硫气体通过 1% 对位盐酸品红水溶液，直至溶液变浅至浅红到草褐，避光室温保存 3 个月或购用 Schiff 试剂（Sigma 395-2-016）；B：1% 高碘酸钠（ $NaI_2O_7 \cdot H_2O$ ）。用 B 喷板至湿室温放 10min 后用二氧化硫在缸内处理板直至板无色为止（3 ~ 5min）。再用 A 轻轻喷即可。

(5) α -Naphthol 试剂：10.5mL α -Naphthol（15g α -Naphthol 溶于 95% 乙醇 100mL）+ 6.5mL 浓硫酸 + 95% 乙醇 40.5mL + 4mL 蒸馏水。

参考文献略