

幽门弯曲菌 DNA G+C mol% 含量 及菌体脂肪酸组成分析

牟杨龙 张振华 辜丽军* 时晓东 陆德源

(上海第二医科大学微生物学教研室)

摘要 对上海地区分离所得的幽门弯曲菌 (CP) 用高压液相色谱法和气相色谱法分别进行了 DNA G + C mol% 含量测定及菌体脂肪酸组成分析, 并同空肠弯曲菌 (CJ) 和结肠弯曲菌 (CC) 进行了比较。CP DNA G + C mol% 含量为 35.7—38.3, 与 CJ 和 CC 相近; CP 的主要脂肪酸组成为 19:0, 14:0, 18:1 和 18:0, 与 CJ 和 CC 明显不同。

关键词 幽门弯曲菌; DNA G + C mol%; 菌体脂肪酸组成

幽门弯曲菌 (*Campylobacter pylori*, CP) 是一种与慢性胃炎、消化性溃疡关系十分密切的细菌, 因它在某些生物学特性上与已认识的弯曲菌属细菌相似, 但又有不同, 曾被称为弯曲菌样细菌, 但 CP 究竟是否弯曲菌属细菌? 它与 CJ 和 CC 之间如何鉴别? 这些都是人们所关心的问题。为此, 我们对上海地区分离的 CP 菌株, 用高压液相色谱和气相色谱法分别测定了其 DNA G + C mol% 和菌体脂肪酸组成, 旨在为这些问题的解决提供依据。

材料和方法

(一) 菌种准备

1. CP 菌株: CP 菌株均由本室在上海第九人民医院, 从慢性胃炎、消化性溃疡病人胃粘膜中分离所得, 并经形态学、生化反应、培养特征证实为 CP。

2. 参考菌种: 空肠弯曲菌 (CJ)-3276 和结肠弯曲菌 (CC)-3278 由波尔多儿童医院

* 本校化学教研室。

在实验过程中, 我们得到了本校测试中心程蕾萍、化学教研室姚诗凯、毛汝雄等同志的帮助, 在此表示谢意。

Megraud F 博士惠赠, CJ-S131 由苏州医学院微生物学教研室提供。

3. 培养方法: 详见文献 1。

(二) CP DNA G + C mol% 含量测定
采用高压液相色谱法。主要参考丁鉴等^[2]的方法。

1. CP DNA 的抽提: 将细菌悬液 (约 15 块平板的菌量) 4000r/min 离心 15 分钟后, 用 0.15mol/L NaCl-0.1mol/L EDTA pH8.0 溶液 (SE 液) 洗一次, 4000r/min 离心 15 分钟, 再悬浮于 10ml SE 液中。加溶菌酶, 使终浓度为 3mg/ml, 37℃ 15 分钟后, 再加入终浓度为 2% 的 SDS, 放 60℃ 水浴 15 分钟。用等体积酚/氯仿·异戊醇 (体积之比为 3/1) 抽提二次后, 再用等体积氯仿/异戊醇 (体积之比为 24/1) 和等体积乙醚各抽提一次, 水相在 pH7.8 10mmol/L Tris-HCl, 1mmol/L EDTA 中透析过夜 (4℃)。透析后的抽提液中加入 100℃, 15 分钟处理后的 RNase, 使终浓度为 200μg/ml, 37℃ 2 小时。加蛋白酶 K, 终浓度为 200μg/ml, 37℃ 轻摇 2 小时, 用等体积酚/氯仿 (体积之比为 1/1) 和等体积氯仿·异戊醇各抽提一次, 水相加 NaCl 至 0.1mol/L, 溶解后, 加入 2 倍体积的冷无水乙醇, 混匀后, -20℃ 过夜, 次日 13000g 离心 30 分钟。

2. 游离碱基的制备: 将上述离心液去上清后, 试管倒放在吸水纸上约 0.5 小时后, 加入 100μl 72% 高氯酸, 待 DNA 完全溶解后, 移

入安瓿中, 熔封管口, 在沸水中水解 1 小时, 放在 4℃ 冰箱待用。

3. 高压液相色谱测定: 用 Shimadzu LC-4A 高压液相色谱仪, 柱为不锈钢制, 4.6 × 250mm; 填充料为 Nucleosil C₁₈, 5μm。流动相为 0.1mol/L pH3.9 甲酸钠, 流速 0.8ml/min, 压力 120kg/cm², 柱温 40℃, 检测器为 UV 254nm, 0.02AuFs, 进样量 10μl, 记录仪为 Shimadzu Chromatopac C-R2AX。

4. 标准溶液的配制: 在电子称 (Sartorius research) 上分别准确称取如表 1 所示的四种核酸碱基 (A: 英国 BDH 产品, G: Sigma 产品, C: 中科院上海生化所产品, T: 上海化学试剂公司产品), 加数滴磷酸, 定容为 10ml 作为标准混合溶液 (混标), 取 10μl 混标注入高压液相色谱仪。

5. 碱基物相对克分子校正因子的测定和 G + C mol% 的计算:

(1) 相对克分子校正因子 (F'_m) 的测定: 用标准 A、T、G、C 混合溶液, 在上述色谱条件下进样, 测量每个峰面积, 按下式计算 A、T、G、C 的相对克分子校正因子 (F'_m):

$$F'_{m(i)} = \frac{A_i m_i M_i}{A_s m_s M_s}$$

式中 A 为峰面积, m 为进样量, M 为分子量, s 为内标物 (本实验以 A 为内标物), i 为待测碱基。测得 F'_m 值见表 1。

表 1 四种碱基的分子量、毫克分子浓度及相对克分子校正因子

碱基	分子量	混标中的量 (mg/10ml)	混标中毫克分子 浓度 (10ml 中)	进样量 × 10 ⁻² mmol/L	$F'_m(i)$
A	135.14	4.17	0.309	3.09	1.00
G	151.10	4.60	0.304	3.04	0.95
T	126.12	6.43	0.510	5.10	1.82
C	111.12	3.94	0.355	3.55	2.37

(2) G + C mol% 计算: 将各待测样品进样后, 测出峰面积, 乘上相对克分子校正因子 (F'_m), 然后归一化。用公式^[3]

$$G + C \text{ mol\%} = \frac{C}{T + C}$$

计算, 求得其克分子百分数。

(三) 细菌菌体脂肪酸组成分析

1. 脂肪酸标准品的处理: 在脂肪酸标准品 (Sigma 产品, EC10A 偶炭链脂肪酸, OC-9 奇炭链脂肪酸, UN-10 不饱和脂肪酸) 中加入 25% 盐酸-甲醇 (体积之比为 1/1) 4ml 后, 再加入 1ml 饱和 NaCl 溶液, 用 4ml 1:1 的乙醚-己烷溶液萃取 3 次后, 有机相加入 1ml 己烷溶解。取 1 μ l 进样, 定出各峰。

2. 样品的处理: 干重 10—20mg 细菌溶于 1ml 蒸馏水中, 然后装入磨口玻璃管中, 加入含 15% NaOH 的水-甲醇 (体积之比为 1/1) 溶液 2—4ml 后, 在 100℃ 水浴中加热 30 分钟。稍冷后, 加入 6NHCl, 使溶液 pH 为 2, 再加入 5ml 25% HCl-CH₃OH 溶液, 100℃ 水浴 15 分钟。冷却后, 用 N₂ 吹去 HCl 至原体积的一半, 然后加入 1ml 饱和 NaCl 溶液。用 12ml 1:1 的乙醚-己烷溶液分 3 次萃取, 萃取后的有机溶液放入磨口具塞离心管中, 水浴 70℃ 蒸发至 1ml 左右, 再用 N₂ 吹至 0.5ml。加入少量 Na₂SO₄ 去除残余水分。4000r/min 离心 15 分钟, 取上层有机相, 加入 1ml 己烷溶解。取 1 μ l 作色谱分析。

3. 气相色谱测定: 色谱仪为日本岛津公司的 GC-9A, 色谱柱为 2% 的 OV-101, 80—100 目, Chromosorb AW, W, DMCS。操作条件: 柱温 180—230℃ 程序升温, 升温速率 4℃/min, 进器温度和检测器 (FID) 温度为 260℃, RANGE = 10², 氮气压力为 0.4kg/cm², 流速为 30ml/min, 空气压力为 0.3kg/cm²。

试验结果

(一) CP DNA G + C mol% 含量

测得 CP DNA G+C mol% 含量为 35.7—38.3, 与 CJ 和 CC 相近 (图 1、2)。

(二) CP 菌体脂肪酸组成

CP 的脂肪酸组成主要是: 十九碳环丙烷酸 (19cyc)、十八碳酸 (18:0)、十八碳烯酸 (18:1) 和十四碳酸 (14:0) (图 3)。CJ 和 CC 相同, 主要是: 十六碳酸 (16:0)、十六碳烯酸

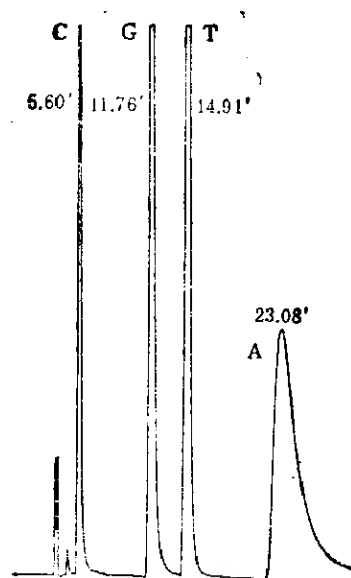


图 1 标准溶液的柱色谱分离图谱

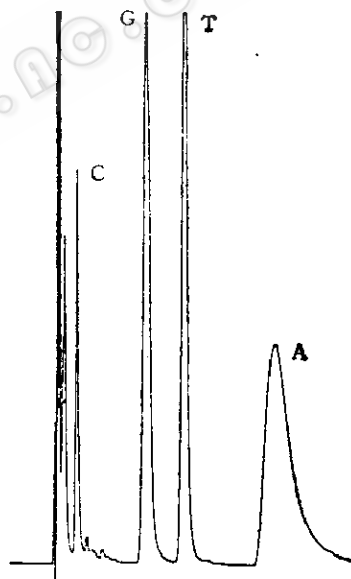


图 2 CP 的 DNA 水解物中碱基组分液相色谱图 (16:1) 和十八碳烯酸 (18:1) (图 4)。

讨论

1. CP 是否是弯曲菌属细菌: 细菌 DNA G + C mol% 含量不同是细菌的一个重要遗传特性, 因此, DNA G + C mol% 在细菌分类学上已作为重要依据之一。我们测得 CP DNA G + C mol% 为 35.7—38.3, 与 CJ 和 CC 相近, 均在弯曲菌属范围内。DNA G + C mol% 含量, 若

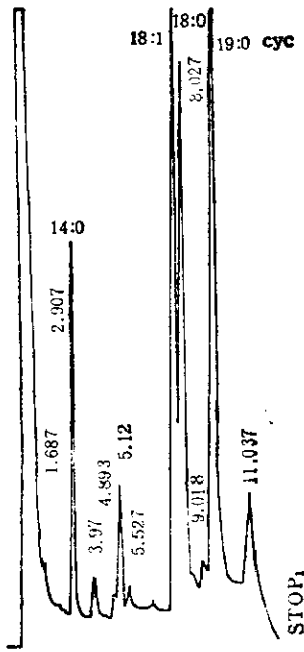


图3 CP酯化脂肪酸气相色谱图

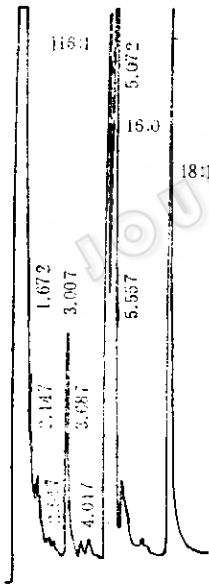


图4 CJ和CC酯化脂肪酸气相色谱图

数值相差较大,具有明确的区分两种不同细菌的意义,但如果两种细菌数值较近,就不能证明它们一定属于同属,因为DNA G+C mol%不能反映DNA中碱基的线性排列关系,不同种

属的细菌间,其DNA G+C mol%含量可有重叠,因此,CP是否弯曲菌属细菌,尚需结合其它特性进行判别。

菌体脂肪酸组成也是细菌分类中的一个重要依据,各种属的细菌都有其特征性的脂肪酸组成类型。我们用气相色谱法测得CP的菌体脂肪酸组成为:19cyc、18:0、18:1和14:0,与CJ和CC明显不同。这与国外文献报道一致^[9]。

文献报道,CP在超微结构上^[9]及某些生化特性^[10]等方面,与CJ和CC亦不同。

上述研究结果,结合文献报道,提示:CP是否是弯曲菌属细菌应重新考虑。

2. CP与CJ和CC的鉴别:由于慢性胃炎和消化性溃疡是临床常见病和多发病,人群中CP的感染率很高,因此,急需一种快速鉴别和诊断CP的方法。目前常根据CP具有高度的尿素酶活性来进行CP的鉴别。但尿素酶活性并非CP所特有,即使是CP,也并非所有CP均有尿素酶活性,经实验室长期保存或多次传代的CP菌株,有时会失去尿素酶活性,因此,这就会影响检查结果。我们用气相色谱分析CP菌体脂肪酸组成的方法,也把CP与CJ和CC区别开来了,这说明,它可能对CP的鉴定是一种较有用的方法,虽然现在用气相色谱法分析CP的脂肪酸组成仍需已经实验室转种培养后的细菌,但是,将来若能从胃粘膜标本直接进行脂肪酸组成分析,根据CP峰形特点,作出鉴别和诊断,或许也能达到快速诊断和鉴别的效果,而且这种方法操作简单、灵敏、重复性好,尤其适合于大量标本的检测。

参 考 文 献

1. 张振华等: 中华消化杂志, 5: 231, 1985.
2. 丁 奎等: 微生物学报, 1: 83, 1981.
3. Ko CY et al.: Anal. Biochem., 86:133, 1977.
4. Itoh T et al.: Microbiol. Immunol., 31:603, 1987.
5. 张振华等: 上海第二医科大学学报, 9: 227, 1989.
6. Clodna A et al.: J. Clin. Microbiol., 25:1683, 1987