

素。

为证实方法的实用性,还作了与其它测定方法的比较试验。对黄曲霉毒素,用本方法和氯仿直接提取法分别测定了四个样品,结果见表3。

表3 本法与氯仿直接提取法测黄曲霉毒素的比较

样品	本法测定 B <sub>1</sub> 结果 (ppb)	氯仿法测定 B <sub>1</sub> 结果 (ppb)
广西19	1756.5	1357.4
广西23	118.8	140.6
广西22	378.4	449.4
甘肃7*	88.9	77.6

\* 甘肃7为阴性样品,加标准毒素后测的结果

从以上几个样品的测定结果看,两种方法的测定结果相近。由于所有检样中未发现黄曲霉毒素 G<sub>1</sub> 阳性样品,因而上表中缺 G<sub>1</sub> 的数据。同时也说明本实验所采样品中黄曲霉毒素的产毒菌为黄曲霉,而不是寄生曲霉,因为后者产生黄曲霉毒素 G<sub>1</sub>、G<sub>2</sub> 的量较 B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub> 多<sup>[6]</sup>。

对棕曲霉毒素 A,我们用作回收率的方法对本方法和魏润蕴等人发表的粮食中棕曲霉毒素 A 的测定方法进行了比较<sup>[1]</sup>。在阴性样品中加 100ppb 的棕曲霉毒素 A 标准,用本法与魏润蕴等人的方法同时测定。测定结果表明,本方法的回收率高(见表4),且展开系统的分离效果好,样点集中。

表4 两种方法测定棕曲霉毒素A回收率结果(%)

本方法	魏润蕴等人方法
87.4, 85.2, 86.1	65.1, 67.0

2. 防止乳化现象的方法:在用本方法的测定过程中,在乙腈水中加 NaHCO<sub>3</sub> 液后用氯仿分配提取黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>、G<sub>1</sub> 时,易发生乳化现象。在第二次用氯仿分配时,加入 10ml 4% 的 NaCl 溶液,可消除乳化现象。

另外在加碱液后应立即加氯仿振荡,以免碱对黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>、G<sub>1</sub> 的破坏。

棕曲霉毒素 A 的薄层板在定量前应先喷碳

酸氢钠乙醇液。那样可使棕曲霉毒素 A 的荧光强度大大增强,从而使最低检出量大为降低,提高检测的灵敏性。

3. 样品的定量方法:本方法用薄层扫描仪对阳性样品进行定量。与目视法相比,具有误差小,操作简便,准确省时的优点。

为确保定量测定的准确可靠,分别用这三种标准毒素作标准曲线,以确定各自定量的线性范围,供定量测定用。结果如图2和图3所示。

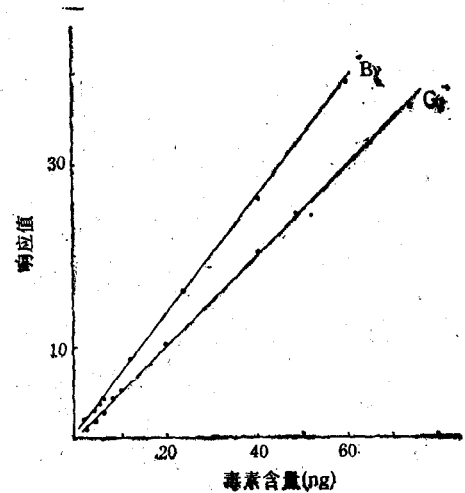


图2 黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>、G<sub>1</sub> 标准曲线

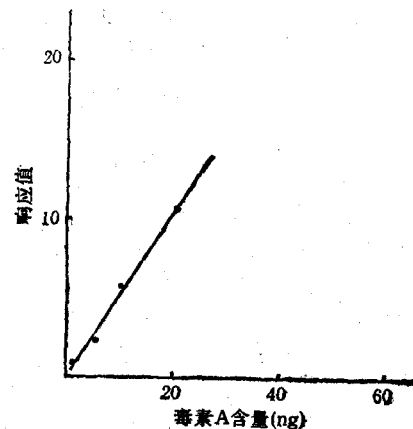


图3 棕曲霉毒素A标准曲线

从图中看出,黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>、G<sub>1</sub> 的线性范围为 0.2—60ng/点(相当于 3.2—960ppb),棕曲霉毒素 A 的线性范围为 0.2—20ng/点(相当于 3.2—320ppb),即样点的毒素含量分别

在上述区间时,峰面积与毒素含量成线性关系;可直接扫描定量;否则应加大点样量或稀释后再点样,方可进行扫描定量。

最低检出量和灵敏度也是评价检测方法的重要项目。本方法对这三种毒素的最低检出量

均为 0.2ng/点,样品的最低检出限量(灵敏度)为 3.2ppb。

4. 配合饲料样品中黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>、G<sub>1</sub> 和棕曲霉毒素 A 的测定结果:用本方法测定一些配合饲料样品的结果见表 5。

表 5 本方法测定饲料中三种毒素结果 (ppb)

样品	AF B <sub>1</sub>	AF G <sub>1</sub>	OA	样品	AF B <sub>1</sub>	AF G <sub>1</sub>	OA
北海1	251.0	—	—	北海2	757.0	—	—
江苏1	30.5	—	—	北海5	—	—	—
江苏2	—	—	14.2	江苏8	—	—	—
广西17	150.7	—	—	浙江9	—	—	310.6
四川7	3.1	—	—	四川9	—	—	26.0
广东30	—	—	1512.0	广东12	—	—	—
辽宁2	—	—	—	辽宁4	—	—	—

AFB<sub>1</sub>, AFG<sub>1</sub> 分别表示黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>、G<sub>1</sub>; OA 表示棕曲霉毒素 A; —为阴性。

综上所述,从回收率,最低检出量,灵敏度及展开系统的分离效果几方面看,本方法是一种适于测定饲料中黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>、G<sub>1</sub> 和棕曲霉毒素 A 的方法。

### 参 考 文 献

1. 魏润蕴等: 卫生研究, 2: 16—20, 1981。
2. 居乃琰编: 黄曲霉毒素, P 120—123, 轻工业出版社, 北

- 京, 1980。
3. Roberts B A and DSP Patterson: Microbiological Techniques, Section 3, Technique AF1 The Animal Feedingsuffs working party conference of advisory microbiologists, Feb., 1980.
4. 中华人民共和国国家标准, 食品卫生检验方法理化部分, P88, 中国标准出版社, 北京, 1986。
5. 吴坤: 郑州粮食学院学报, 1: 47—56, 1987。
6. 角田廣等著, 孟昭赫, 孙玉书译: 真菌毒素图解, P.40, 人民卫生出版社, 北京, 1983。

## 放线菌细胞壁化学组分分析方法的研究

梁蓉芳 袁德军 夏涛\* 覃重军

(华中农业大学农抗研究室, 武汉)

**摘要** 在总结前人工作的基础上对放线菌细胞壁氨基酸成分的测定方法进行了改进, 使全细胞水解液测定的操作过程比原有的方法快速; 通过全细胞与细胞壁测定的比较表明, 细胞壁获得的结果可靠; 采用碱法提取细胞壁比常用的酶法更简单易行, 而且效果相近。

**关键词** 胞壁组分分析; 细胞壁

细胞壁氨基酸组成是放线菌分类的重要指标之一。测定细胞壁氨基酸成分的方法虽有很多报道和不断改进<sup>[1-3]</sup>, 但有的过程和方法依然有值得进一步提高的必要。为此我们在总结前人工作的基础上进行了一些研究, 目的是要建立一种操作简便快速, 分辨率高而准确的测定

方法。现将部分实验结果报道如下。

### 材 料 和 方 法

#### 1. 菌株

\* 本校中心实验室。

(1) 涂链霉菌房县变种 (*Streptomyces endus* var. *fangxianensis*) SH-62 菌株。

(2) 孢囊类小多孢菌 (*Micropolysporoides sporangium*) W429A 菌株 (一个新属新种, 待发表)

2. 微晶纤维素 (Microcrystalline cellulose E. Merck), 上海化学试剂采购供应站进口分装。

3. D, L-2, 6-二氨基庚二酸, Sigma 化学公司产品。

4. 氨基酸分析仪, 日立 835-50 型氨基酸分析仪。

## 结 果

### (一) 全细胞胞壁氨基酸快速测定法的改进

全细胞水解液测定氨基酸组分的方法, 过去一直沿用 Becker 的纸层析法<sup>[1]</sup>, 但此法不仅复杂费时, 而且不易将二氨基庚二酸 (DAP) 的三个异构体完全分开, 特别是 meso-DAP 和 3-OH-DAP 不易分开。Hasegawa 改用微晶纤维素制成的薄板进行薄层层析<sup>[2]</sup>, 并直接用斜面菌苔的全细胞水解液测定细胞壁氨基酸组成, 这个方法简单易行而又快速, 缺点仍是不易将 mesoDAP 和 3-OH-DAP 分开。王平通过展层剂的改进<sup>[3]</sup>, 使 DAP 的三个异构体在微晶纤维素薄板上能清楚分开, 不足之处是在菌丝体样品的制备上要花费一定时间。我们在总结这些工作的基础上, 作了进一步的修改, 不仅使分析样品的时间大大缩短, 全过程只需要 4 个小时左右, 而且 DAP 的三个异构体也能明显区分。具体方法如下: 挖取一小块斜面菌苔, 放入 1.0 × 10cm 的硬质小试管中, 加 6mol/L HCl 0.1ml, 塞上橡皮塞, 在 121℃ 灭菌锅中水解 15 分钟, 然后将水解液倒在 5ml 小烧杯中, 在水浴上加热, 驱赶 HCl 1—2 次, 在蒸干的小烧杯中加少量蒸馏水溶解, 即可在微晶纤维素薄板上点样。并在甲醇:吡啶:冰醋酸:水(10:1:0.25:5) 的展层剂中展层 3 小时, 茚三酮显色。

采用这种方法, 以菌丝体为对照, 我们比较

测定了不同斜面培养基生长的菌苔和不同培养时间 (5—120 天) 的斜面菌苔的胞壁氨基酸成分, 结果都获得了相同的效果 (图 1, 2)。这不仅说明斜面菌苔完全可以代替菌丝体, 而且表明胞壁氨基酸成分是很稳定的, 它不受培养基成分和菌龄的不同而发生变化。

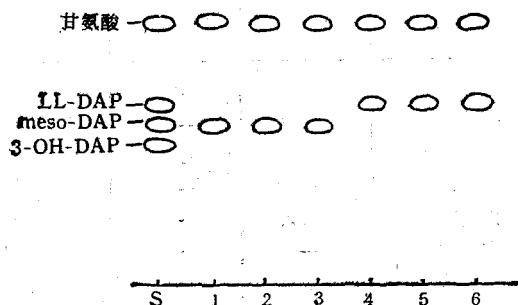


图 1 SH-62 和 W429A 在不同培养基中的全细胞水解液氨基酸层析图谱 1, 2, 3 为 W429A 菌株; 4, 5, 6, 8 SH-62 菌株; 1, 4 为菌丝体; 2, 5 为高氏一号斜面菌苔; 3, 6 为燕麦斜面菌苔; S 为混合氨基酸标准液

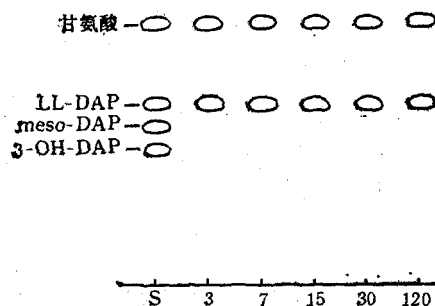


图 2 SH-62 菌株不同培养时间的全细胞水解液氨基酸层析图谱 (S: 为混合氨基酸标准液)

### (二) 全细胞与细胞壁氨基酸成分分析的比较

我们以菌株 W429A 为样品, 按王平的方法 (简称酶法) 制备细胞壁, 并以全细胞和标准品为对照, 同时进行薄层层析。结果表明, 标准品的三个异构体分得很清楚; 用全细胞水解液测定的只含有 meso-DAP; 而用细胞壁测定, 则除了含有 meso-DAP 外, 尚有少量的 LL-DAP 和 3-OH-DAP (图 3)。说明采用细胞壁, 由于浓缩的结果, 可使少量成分亦能在薄板上显示出来。因此, 作为放线菌分类的重要指标之一, 细胞壁氨基酸成分的测定, 最好采用细