

DNA 分子标记技术在乳酸菌多态性研究中的应用

剧 柠 靳 焱*

(内蒙古农业大学食品科学与工程学院 呼和浩特 010018)

摘 要: 本文概述了常用于乳酸菌分离鉴定及多态性研究中的基于 rDNA 序列的分子标记技术和几种 DNA 指纹图谱技术(RAPD, ARDRA, AFLP, REP/ERIC-PCR), 并对这些技术的原理、方法及其近几年在乳酸菌研究中的进展进行了介绍。同时本文还比较了各种方法的优缺点, 不同的研究方法, 其分辨率和检测限不同, 必须根据研究目的, 选择合适的分析方法。

关键词: 乳酸菌, DNA 标记技术, 分类, 鉴定, 多样性

The Application of Molecular Marking Technology in Diversity Research of Lactic Acid Bacteria

JU Ning JIN Ye*

(Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018)

Abstract: This paper outlines some molecular marking technology based on rDNA sequences and several DNA fingerprinting technology (RAPD, ARDRA, AFLP, REP/ERIC-PCR) used in classification, identification and diversity research in lactic acid bacteria. The principles, methods and progress in recent years of these technologies were also introduced. At the same time, this paper also compares the advantages and disadvantages of these methods. People should choose suitable method according to their purposes.

Keywords: Lactic acid bacteria, DNA marking technology, Classification, Identification, Diversity

对人类具有益生作用的乳酸菌越来越多地受到了世界营养学家和临床学者的关注。这些有着丰富生态多样性的乳酸菌作为食品添加剂和生物治疗药物所表现出的潜在益生特性近年来也越来越多地得到人们的重视。对这些微生物正确地鉴定是评价其安全性的第一步。然而, 传统上对微生物的鉴定分类是利用形态学和生理学特征及其差异来进行的, 难以保证分类的准确性和科学性, 不能正确反应微生态, 使微生物资源大量丢失^[1]。随着分子生物学的快速发展, DNA 标记技术为乳酸菌的快速鉴定和分型提供了借鉴。本文介绍几种主要应用于乳酸菌分

类鉴定及其多态性研究中的 DNA 标记技术。

1 基于 rDNA 序列的分子标记技术

1.1 16S rDNA 序列同源性分析

原核生物核糖体 rRNA 含有 3 种类型: 23S rRNA、16S rRNA、5S rRNA, 它们分别含有约 2900、1540 和 120 个碱基。rRNA 的结构既具有保守性, 又具有高变性, 所以其测定成为目前鉴定细菌基因性状关系应用技术中最具权威性和准确性的检测方法之一。60 年代末, Woese 通过比较各类生物细胞的核糖体 RNA 特征序列, 认为 16S rDNA 及其类似

* 通讯作者: Tel: 0471-4309230; ✉ jinyeyc@yahoo.com.cn

收稿日期: 2008-01-13; 接受日期: 2008-03-21

的 rDNA 基因序列作为生物系统发育指标最为合适。

16S rDNA 序列分析技术的基本原理是从乳酸菌样本中,通过克隆、测序或酶切、探针杂交获得 16S rDNA 序列信息,再与 16S rDNA 数据库中的序列数据或其他数据进行比较,确定其在发育树中的位置,从而鉴定其种类。随着核酸测序技术的发展,越来越多的乳酸菌 16S rDNA 序列被测定并收入国际基因数据库中,这样用 16S rDNA 作目的序列进行微生物群落结构分析更为快捷方便。

在国内,采用 16S rDNA 序列分析与传统的分离鉴定方法相结合来鉴定乳酸菌越来越多地得到认可。燕平梅等^[2]以发酵甘蓝卤水中微生物的总 DNA 为模板,用扩增革兰氏阳性菌 16S rDNA 基因的方法研究中国发酵甘蓝菜卤中乳酸菌的多样性。国外,16S rDNA 用来鉴定乳酸菌被公认为是有效且可靠的分子分型方法,它可以在属种水平上定义任意一个给定的菌株。但是,16S rDNA 序列分析不能对分类相近的双歧杆菌和乳杆菌进行有效区分,且不能在种内水平上分析出菌株的差别^[3,4]。

1.2 rDNA 转录间隔区序列分析

转录间隔区序列(Internally transcribed spacer sequences, ITS)是指 rDNA 操纵子中位于 16S rDNA 和 23S rDNA, 23S rDNA 和 5S rDNA 之间的序列。不同菌种的 16S-23S rDNA 基因间隔区具有相当好的保守性,同时较 16S rDNA 又具有更强的变异性。该方法用于种以下水平的分类鉴定,引物往往需要根据 16S rDNA 和 23S rDNA 基因两侧高度保守的区域进行设计。

Suzuki K 等^[5]使用 16-23S rDNA 间区序列分析方法将 16S rDNA 不能区分开的乳酸菌区分开来,提供了一种快速敏感的检测啤酒变质的方法。Hyuk-Sang Kwon 等^[6]。使用该方法鉴定了分离自药物和乳制品中的 8 种高度专一的双歧杆菌,同时证明了该方法也可以用来筛选肠道及粪便中的相关菌种。

1.3 16S rDNA 扩增片段的碱基差异分析

KlijnN 等研究发现,在乳酸菌 16S rRNA 基因内部存在着 3 个可变区域 V1、V2 和 V3 区。由于不同菌株的 16S rRNA 基因的碱基组成不同,通过 PCR 扩增这些可变区,得到的相同大小的 DNA 片段,

经过温度梯度凝胶电泳(TGGE)、瞬时温度梯度凝胶电泳(TTGE)和变性梯度凝胶电泳(DGGE)后,会被分离开来。根据扩增片段出现的位置就可鉴定样品中含有的优势乳酸菌的种类。近年来, DGGE 被广泛用于检测食品和其他环境样品中的乳酸菌。

DGGE 技术是由 Fischer 和 Lerman 于 1979 年最先提出的,用于检测 DNA 突变的一种电泳技术。它的分辨精度比琼脂糖电泳和聚丙烯酰胺凝胶电泳更高,可以检测到一个核苷酸水平的差异。1985 年,Myers RM^[7]等人首次在 DGGE 中使用“CC 夹板”和异源双链技术,使该技术日臻完善。1993 年, Muzyers^[8] 等首次将 DGGE 技术应用于分子微生物学研究领域,并证实了这种技术在揭示自然界微生物区系的遗传多样性和菌群差异方面具有独特的优越性。近年来,此技术被广泛应用于各种环境微生物生态的研究。

DGGE 分析微生物群落的一般步骤如下: 1) 核酸的提取; 2) 16S rDNA 或功能基因片段的扩增; 3) 通过 DGGE 分析 PCR 产物。DGGE 使用具有化学变性剂梯度的聚丙烯酰胺凝胶,该凝胶能够有区别的解链 PCR 扩增产物。由于 PCR 产生的不同的 DNA 片段长度相同但核苷酸序列不同,因此不同的双链 DNA 片段沿着化学梯度的不同,解链行为将在凝胶的不同位置上停止迁移。DNA 解链行为的不同导致一个凝胶带图案,该图案是微生物群落中主要种类的一个轮廓。

目前 DGGE 技术在肠道乳酸杆菌、双歧杆菌,发酵酸面团等食品以及其他益生菌剂的优势菌群的检测及鉴定中都有成功报道^[9,10]。Nicholas Camu 等^[11]使用 DGGE 技术对加纳可可豆发酵过程中的生物多样性进行了分析,确定了存在其中的优势菌。RCR-DGGE 技术用时短,能直接反映菌群间的进化关系,是一种简单、快速的检测手段。付琳琳等^[12]用 DGGE 技术对泡菜液中微生物的 16S rDNA 的 V7-V8 区进行分析,结果表明 DGGE 和克隆技术相结合是研究泡菜中乳酸菌多样性的可行方法。利用 DGGE 技术对乳酸菌进行分类和鉴定是一种很有前景的直接鉴定方法。DGGE 在乳酸菌的分类和鉴定中具有广泛的应用,但是其提供的系统发育信息有限,通常只能检测到环境中优势菌的存在^[8]。因此,为了提高对非优势菌群的检测,需要选用种群特异性的引

物再加以区分。

2 DNA 指纹图谱技术

2.1 扩增 rDNA 限制性分析(ARDRA)

1980 年 Botesin 提出限制性片段长度多态性分析(Restriction fragment length polymorphisms, RFLP), 是最早应用的分子标记技术^[13]。在此技术上发展起来的 ARDRA (Amplified rDNA Restriction Analysis) 技术, 是美国最新应用的基于 PCR 和 RFLP 技术相结合的一种 rDNA 限制性片段长度多态性技术^[14]。它依据原核生物 rDNA 序列的保守性, 将扩增的 rDNA 片段进行酶切, 然后通过酶切图谱来分析菌间多样性。ARDRA 更适用于细菌种和亚种水平的鉴定^[15]。由于此法是对某一基因进行 RFLP 分析, 因此产生的条带较少, 结果较易分析。在菌种鉴定中具有特异、敏感、快速、准确等特点。但是, 由于利用的是局部的基因信息, 有时也可能导致分辨率的下降。

Christian Michel 等^[16]使用该技术对不同来源的 22 种菌进行分析, 探讨了鱼及其生存环境中的乳酸菌的多样性, 探明了其中存在的乳酸菌。Giorgio Giraffa 等^[17]使用全基因序列和 ARDRA 分析方法对干酪中的乳酸菌进行分析, 为描述瑞士乳杆菌的微生物生态系提供了基础。Rachman CN 等^[18]的实验证实当对 16S-23S rDNA 相近的乳酸菌使用 RFLP 技术进行鉴定时可以很好的将香肠乳杆菌、消化乳杆菌、弯曲乳杆菌和植物乳杆菌区分开来。

2.2 随机扩增多态性 DNA 技术(RAPD)

随机扩增多态性 DNA 技术(Random Amplified Polymorphic DNA, RAPD)是以 PCR 扩增为基础的分子标志技术, 它以基因组 DNA 为模板, 采用随机引物进行 PCR 扩增, 获得多态性的 DNA 片段, 经凝胶电泳分析后将呈现出一定形式的谱带, 即 DNA 指纹图谱, 以此进行未知菌株的分类和鉴定^[19]。RAPD 技术可用于细菌种间、亚种间乃至株间的亲缘关系分析, 未知菌株的快速鉴定和流行病学调查等^[20]。

与 RFLP 相比, RAPD 技术简单、检测速度快、DNA 用量少、安全性好。但是 RAPD 技术有其自身的缺点, 其对反应条件相当敏感, 实验的稳定性和重复性差, 实验结果可靠性差^[21,22]。因此, 近几年

RAPD 用于乳酸菌鉴定, 常与其他分子方法相结合, 如 DGGE, AFLP 等。

2.3 扩增片段长度多态性分析(AFLP)

扩增片段长度多态性(Amplification Fragment Length Polymorphism, AFLP)分析是 RFLP 技术和 PCR 技术相结合发展而成一种新型 DNA 指纹图谱技术, 被认为是迄今为止最有效的分子标记技术^[23]。AFLP 的基本原理就是利用 PCR 技术选择性扩增基因组 DNA 双酶切的限制性片段。基因组 DNA 经限制性内切酶消化后, 将一双链 DNA 接头连接于限制性片段的两端。然后根据接头序列和限制位点邻近区域的碱基序列, 设计一系列 3' 末端含数个随机变化的选择性碱基的 PCR 引物, 进行特异性扩增。只有那些限制位点的侧翼序列与引物 3' 末端选择碱基相匹配的限制片段才能得以扩增。扩增产物经变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离而显示其多态性。

AFLP 技术通过特异性 PCR 引物设计和内切酶组合的选择, 来调整 AFLP 图谱中限制性片段的适宜数目, 具有一定的灵活性。严格的 PCR 条件和高分辨率的聚丙烯酰胺凝胶电泳, 使 AFLP 重复性好, 分辨率高。而且 AFLP 标记比 RFLP、RAPD 标记更为可靠、有效地揭示微生物多态性水平的能力, 为研究微生物菌株间差异提供了有效手段^[24]。该方法的不足之处是对操作人员素质及 DNA 质量要求较高, 这影响了它的广泛应用。

利用 AFLP 技术可对遗传学上关系密切菌种, 如戊糖乳杆菌、植物乳杆菌和类植物乳杆菌进行种水平的鉴定^[17]。Geert Huys 等^[25]比较分析了不同分子标记的方法对商用菌株的鉴定, 结果表明 AFLP 在区分相近关系的乳酸菌上十分有效, 与 PFGE 和 RAPD 相比有其独特的优势。在国内, AFLP 指纹图谱用来鉴定乳酸菌的报道较少。李海星^[26]等运用 AFLP 技术对分离自发酵酸面团中的 20 株乳酸菌进行了研究, 做了其在乳酸菌方面的应用尝试。孙志宏^[27]采用 AFLP 的分子标记方法研究了自然发酵酸马奶中的乳杆菌的 DNA 多态性。

2.4 基因组简单重复序列 PCR 标记

细菌基因组中广泛分布着简单重复序列。目前, 在细菌基因组中已发现存在 10 种以上可用于 DNA 指纹分析鉴定的简单重复序列, 其中研究较多的

主要是重复基因外回文序列(Repetitive Extragenic Palindromic, REP) 和肠细菌重复基因间基准序列(Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus, ERIC)。这些简单重复序列分布在细菌基因组上的不同位点并以不同的距离分隔, 存在菌株和种属水平上的差异。因此以这些重复的 DNA 序列作为 PCR 扩增时引物的结合位点, 使其被分隔的 DNA 序列大量的扩增, 然后在凝胶电泳上形成一系列的谱带, 以此作为不同细菌的 DNA 标记决定细菌基因型, 来区分检测不同的细菌。

基因组简单重复序列 PCR 标记首先要设计特异性的引物, 然后通过 PCR 反应扩增细菌 DNA 重复元件如 ERIC, BOX 或者 (GTG)₅ 等。该技术由于引物序列是固定的, 与相似的 RAPD 技术相比, 结果的重复性较好。

3 展望

综上所述, 近几年来由于分子标记技术在微生物方面的发展, 越来越多的分子标记方法应用于乳酸菌的分析。以上所描述的几种主要方法, 各自都有其优点和缺陷。随着分子生物学技术, 尤其是 PCR、核酸测序和电泳技术的不断改进与完善, 其快速、准确、灵敏的优点将逐渐成为乳酸菌分类研究的主要手段。

参 考 文 献

- [1] 雷正瑜. 16S rDNA 序列分析技术在微生物分类鉴定中的应用. 湖北生态工程职业技术学院学报, 2006, 4: 4-7.
- [2] 燕平梅, 张 慧, 薛文通, 等. 16S rRNA 基因序列方法分析传统发酵菜中乳酸菌多样性. 中国食品学报, 2007, 7(2): 119-123.
- [3] Torriani S, Felis GE, Dellaglio F. Differentiation of *Lactobacillus plantarum*, *L. pentosus*, and *L. paraplantarum* by *recA* gene sequence analysis and multiplex PCR assay with *recA* gene-derived primers. *Appl Environ Microbiol*, 2001, 67(8): 3450-3454.
- [4] Mercenier A, Pavan S, Pot B. Probiotics as biotherapeutic agents: present knowledge and future prospects. *Curr Pharm Design*, 2003, 9(2): 175-191.
- [5] Suzuki K, Koyanagi M, Yamashita H. Genetic characterization and specific detection of beer-spoilage *Lactobacillus* sp. LA2 and related strains. *Journal of Appl Microbiol*, 2004, 96(4): 677-683.
- [6] Kwon Hyuk-Sang, Yang Eun-Hee, Lee Seung-Hun, *et al.* Rapid identification of potentially probiotic bifidobacterium species by multiplex PCR using species-specific primers based on the region extending from 16S rRNA through 23S rRNA. *Fems Microbiol lett*, 2005, 250(1): 55-62.
- [7] Myers RM, Fischer SG, Lerman LS, *et al.* Nearly all single base substitutions in DNA fragment joined to a GC-clamp can be detected by denaturing gradient gel electrophoresis. *Nucleic Acids Res*, 1985, 13(9): 3131-3145.
- [8] Muyzer G, de Weel EC, Uittlindern AG. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction amplified genes coding for 16SrRNA. *Appl Environ Microbiol*, 1993, 59 (3): 695-700.
- [9] Endo A Okda. Monitoring the lactic acid bacterial diversity during Shochu fermentation by PCR denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl Environ Microbiol*, 2004, 99(3): 216-221.
- [10] Coeolin L, Manzano M, Carlo Cantoni, *et al.* Denaturing gradient gel electrophoresis analysis of the 16S rRNA gene VI region to monitor dynamic change in the bacterial population during fermentation of Italian sausages. *Appl Environ Micorbiol*, 2001, 67(11): 5113-5121.
- [11] Nicholas Camu, Tom De Winter, Kristof Verbrugghe, *et al.* Biodiversity of populations of lactic acid bacteria and acetic acid bacteria involved in spontaneous heap fermentation of cocoa beans in Ghana. *Appl Environ Microbiol*, 2007, 73(6): 1809-1824.
- [12] 付琳琳, 曹郁生, 李海星, 等. 应用 PCR-DGGE 技术分析泡菜中乳酸菌的多样性. 食品与发酵工业, 2005, 31(12): 103-105.
- [13] 李 娜, 张 敏, 崔 彬, 等. PCR-RFLP 技术在兽医寄生虫学上的应用. 动物医学进展, 2007, 28(1): 92-95.
- [14] Vaneechoutte, Roseau MR, Devos P, *et al.* Rapid identification of bacteria of the Comamonadaceae with amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA). *FEMS Microbiol Lett*, 1992, 93(3): 227-234.
- [15] 张 刚. 乳酸细菌-基础、技术和应用. 北京: 化学工业出版社, 2007, p.183.
- [16] Christian Michel, Claire Pelletier, Mekki Boussaha, *et al.* Diversity of lactic acid bacteria associated with fish and the fish farm environment, established by amplified rRNA gene restriction analysis. *Appl Environ Microl*, 2007, 73(9): 2947-2955.
- [17] Giorgio Giraffa, Monica Gatti, Lia Rossetti, *et al.* Molecular diversity within *Lactobacillus helveticus* as revealed by genotypic characterization. *Appl Environ Microl*, 2000, 66(4): 1259-1265.
- [18] Rachman CN, Kabadjova P, Prévost H, *et al.*

- Identification of *Lactobacillus alimentarius* and *Lactobacillus farciminius* with 16S-23S rDNA intergenic spacer region polymorphism and PCR amplification using species-specific oligonucleotide. *Journal of Applied Microbiology*, 2003, **95**(6): 1207-1216.
- [19] Williams JGK, Kubelik AR, Livak Kenneth J, *et al.* DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res*, 1990, **18**(22): 6531-6535.
- [20] 周晓杨, 肖仁普. 分子生物学方法在微生物生态学研究中的应用. 重庆文理学院学报, 2007, **26**(4): 57-60.
- [21] 赵淑清, 武维华. DNA 分子标记和基因定位. 生物技术通报, 2000, **6**: 1-4.
- [22] 王志林, 赵树进, 吴新荣. 分子标记技术及其进展. 生命的化学, 2001, **21**(1): 39-42.
- [23] 杨振泉, 顾瑞霞. DNA 标记技术在乳酸菌分类鉴定中的应用. 中国乳品工业, 2005, **33**(5): 35-39.
- [24] Javier Gallegoa F, Angeles Pe' rezb M, Yolanda Nu'n~ez, *et al.* Comparison of RAPDs, AFLPs and SSR markers for the genetic analysis of yeast strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Microbiology*, 2005, **22**(6): 561-568.
- [25] Geert Huys, Marc Vancanneyt, D'Haene Klaas, *et al.* Accuracy of species identity of commercial bacterial cultures intended for probiotic or nutritional use. *Research in Microbiology*, 2006, **157**(9): 803-810.
- [26] 李星海, 曹郁生, 付琳琳, 等. AFLP 技术对发酵面团中乳酸菌多态性研究. 微生物学杂志, 2005, **9**(25): 50-53.
- [27] 孙志宏. 自然发酵酸奶中乳杆菌的 DNA 多态性研究. 内蒙古农业大学硕士学位论文, 2006.

征 稿 简 则

1 刊物简介与栏目设置

《微生物学通报》是由中国科学院微生物研究所和中国微生物学会主办的, 以微生物学应用基础研究及高新技术创新为主的综合性学术期刊。刊登内容包括: 微生物学、生物工程、病毒学、酶工程、发酵工程、细胞工程等领域的最新研究成果, 产业化新技术和新进展。设置的栏目有: 研究报告、专论与综述、生物实验室(原技术与方法)、高等院校教学、名师讲堂、教学与科研成果展示、显微世界、专题专栏、专家论坛、书讯、会讯等。

2 投稿方式

投稿时请登陆我刊主页 <http://journals.im.ac.cn/wwxtbcn>, 点击作者投稿区, 第一次投稿请先注册, 获得用户名和密码, 然后依据提示提交稿件, 详见主页“投稿、征稿须知”。

作者必须在网站投.doc 格式的电子稿, 图与文字编好页码、图号后合成一个文件上传。凡不符合(投稿须知)要求的文稿, 本部恕不受理。

3 写作要求

来稿要求论点明确, 数据可靠, 简明通顺, 突出重点。

3.1 篇幅

以 A4 纸 5 号字计算, 综述、教学和方法类文章最好在 3 页以内, 研究报告 4-6 页(以上均包括图表)。

3.2 图表

文中的图表须清晰简明, 文字叙述应避免与图表重复。所有小图的宽度应小于 8 cm(占半栏), 大图的宽度应小于 17 cm(通栏)。

3.3 参考文献及脚注

参考文献按文内引用的先后顺序排序编码, 未公开发表的资料请勿引用。我刊的参考文献需要注明著者(文献作者不超过 3 人时全部列出, 多于 3 人时列出前 3 人, 后加“等”或“*et al.*”, 作者姓前、名后, 名字之间用逗号隔开)、文献名、刊名、年卷期及页码。国外期刊名可以缩写, 但必须标准, 斜体。参考文献数量不限。

参考文献格式举例:

期刊: [1] 刘 杰, 成子强, 史宣玲. SARS 冠状病毒 *nsp14* 基因的克隆和表达. 微生物学通报, 2007, **34**(2): 1-3.

[2] Kajiura H, Mori K, Tobimatsu T, *et al.* Characterization and mechanism of action of a reactivating factor for adenosylcobalamin-dependent glycerol dehydratase. *J Biol Chem*, 2001, **276**(39): 36514-36519.

图书: [3] 钱存柔, 黄仪秀. 微生物实验教程. 北京: 北京大学出版社, 2000, p. 4.

[4] 董志扬, 张树政, 方宣钧, 等. 海藻的生物合成及抗逆机理. 见: 华 珞等. 核农学进展. 北京: 中国农业出版社, 1996, pp. 115-120.

脚注(正文首页下方):

基金项目: 基金项目资助 (No.)

*通讯作者: Tel: ; Fax: ; 信箱:

收稿日期: 2008-00-00; 接受日期: 2008-00-00

(下转 p. 1328)