

属特异性 T-RFLP 技术在双歧杆菌群落分析中的应用

熊婧^{1Δ} 张思璐^{2Δ} 魏霜³ 许梦庭¹ 张静怡¹ 唐书泽¹ 吴希阳^{1*}

(1. 暨南大学 理工学院 食品科学与工程系 广东 广州 510632)

(2. 无限极(中国)有限公司 广东 广州 510632)

(3. 汕头出入境检验检疫局 广东 汕头 515041)

摘要:【目的】以双歧杆菌标准菌株为材料, 构建双歧杆菌属特异性末端限制性片段长度多态性分析(T-RFLP)技术, 用于微生物群落中双歧杆菌的特异性分析。【方法】采用 16S rRNA 基因的双歧杆菌属特异性引物, 5'-端用 HEX 荧光标记, 结合通用引物 1510r 进行双歧杆菌特异性 PCR 扩增, 软件模拟酶切后选取 *Hae* III 和 *Alu* I 进行限制性酶切, 对酶切消化产物的荧光标记末端测序得到 T-RFLP 峰谱图。同时将该技术与实验室已建立的乳酸杆菌属特异性 T-RFLP 技术相结合, 建立多相 T-RFLP 技术应用于对市面上益生菌产品的时效性检测。【结果】建立的方法能够快速准确地对不同种的双歧杆菌及合生元产品中的益生菌进行定性或半定量分析。【结论】据此, 成功搭建 T-RFLP 技术用于微生态环境中双歧杆菌的检测, 并成功将多相 T-RFLP 技术用于市售益生菌产品的时效性检测。

关键词: 双歧杆菌, T-RFLP 技术, 属特异性引物

Genus-specific T-RFLP technique for differentiating Bifidobacteria community in probiotics

XIONG Jing^{1Δ} ZHANG Si-Lu^{2Δ} WEI Shuang³ XU Meng-Ting¹ ZHANG Jing-Yi¹
TANG Shu-Ze¹ WU Xi-Yang^{1*}

(1. Department of Food Science and Engineering, College of Science and Engineering, Jinan University, Guangzhou, Guangdong 510632, China)

(2. Infinitus (China) Co. Ltd., Guangzhou, Guangdong 510632, China)

(3. Shantou Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Shantou, Guangdong 515041, China)

Abstract: [Objective] A Bifidobacteria genus-specific T-RFLP technique was developed to differentiate *Bifidobacterium* strains in microbial communities. [Methods] A Bifidobacteria genus-specific primer (g-bifid-F), based on the bacterial 16S rRNA gene sequence, was 5'-labeled with hexachlorofluorescein (HEX), followed by PCR with a 16S universal primer (1510r). The PCR amplicon was then digested by restriction enzyme *Hae* III and *Alu* I before terminal sequencing to achieve T-RFLP profiles. Moreover,

基金项目: 2012 年广东省自然科学基金项目(No. S2012010008479); 暨南大学引进优秀人才科研启动基金项目(No. 51207053)

*通讯作者: Tel: 86-20-85226395; Fax: 86-20-85226630; ✉: tkentwu@jnu.edu.cn

Δ共同第一作者

收稿日期: 2014-04-03; 接受日期: 2014-05-26; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2014-06-12

combined with a *Lactobacillus* genus-specific T-RFLP technique in our lab's previous study, this technique was used to detect bacterial composition and the compositional dynamic of a commercial probiotic product—Biostime. **[Results]** This technique was more specific than the traditional T-RFLP using universal primers, which could be used to detect or semi-quantitate different species of Bifidobacteria. **[Conclusion]** A Bifidobacteria genus-specific T-RFLP technique was well-established, and a combined system of these two T-RFLP techniques was successfully applied to commercial probiotic product detection.

Keywords: Bifidobacteria, T-RFLP technique, Genus-specific primers

肠道微生物的组成及数量在人体健康中发挥着重要的作用,人的肠道健康状况能够从肠道乳酸杆菌及双歧杆菌的数量和组成中反映出来^[1]。双歧杆菌是严格厌氧的革兰氏阳性菌,在成人肠道中占3%–7%,在新生儿的肠道中高达91%^[2-3]。双歧杆菌是益生菌的一种,其具有免疫调节功能,通过产生有机酸及多种天然抗菌物质抑制致病菌和腐败菌的生长繁殖,使肠道内微生态维持平衡^[4]。迄今已报道的双歧杆菌共有32种,其中的5种,乳双歧杆菌、两歧双歧杆菌、长双歧杆菌、婴儿双歧杆菌和青春双歧杆菌为人体肠道内最常见的优势双歧杆菌,已被用于酸奶、奶酪、冰淇淋等市售益生菌产品中^[5]。

由于双歧杆菌种间生理生化特性相似,无法用传统检测技术对微生物群落中双歧杆菌进行有效的分类和鉴定,而且传统的选择性培养基培养方法耗时、耗力等缺陷严重滞后了对肠道微生态监控以及评估益生菌产品的迫切需要,因此,不依赖于培养的微生物群落分析方法的分子生物学技术被广泛应用。其中,T-RFLP技术具有分辨率高、输出定量的数据结果、可实现自动化及互联网海量数据共享等优势,是环境微生物群落分析最强有力的工具之一^[6-7]。该技术首先选用荧光物质标记引物的5'端,用该对引物对目的片段进行PCR扩增,所得的PCR产物的一端即带有这种荧光标记。PCR产物用限制性内切酶进行酶切,不同细菌核苷酸序列的差异导致了酶切位点的差异,于是酶切后会产生不同片段大小的产物。酶切产物通过测序仪进行扫描,只有带荧光标记的片段能够被检测到。不同的末端限制性片段代表了不同的细菌,这些末端标记的片段即反映了微生物群落的组成情况^[8-11]。

常规 T-RFLP 技术采用 16S rRNA 基因通用引

物进行 PCR 扩增,会因对优势菌群的 PCR 趋向性而漏检一些非优势的菌群。本实验室已成功建立了乳酸杆菌属特异性 T-RFLP 技术并用于研究人体肠道乳酸杆菌群落的变化^[12];在此基础上,本研究致力于搭建分子生态学技术用于另一重要益生菌——双歧杆菌群落检测的平台。本研究采用了改进的 T-RFLP 技术,选用双歧杆菌属特异性引物对所有双歧杆菌进行 PCR 扩增,之后根据其 16S rRNA 基因序列的差异性进行酶切。酶切消化产物通过 T-RFLP 分析检测出不同种的双歧杆菌,能够系统地分析出微生态中双歧杆菌的分布。同时,本研究将双歧杆菌属特异性 T-RFLP 技术与本实验室已搭建的乳酸杆菌属特异性 T-RFLP 技术相结合,应用于对市面上的益生菌产品——合生元的时效性检测。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验菌种: 本研究选用的5种双歧杆菌均为人源性双歧杆菌,同时选择了植物乳杆菌、嗜酸乳杆菌、鼠李糖乳杆菌、枯草芽孢杆菌、嗜热链球菌、金黄色葡萄球菌和大肠杆菌作为试验对照菌株(表1)。

1.1.2 受试样品: 合生元牌益生菌冲剂(儿童型)——合生元(广州)健康产品有限公司,标识含嗜酸乳杆菌(6.4×10^{11} CFU/100 g)、两歧双歧杆菌与婴儿双歧杆菌(共计 1.9×10^{10} CFU/100 g)。

1.2 引物设计

本研究选用正向引物为双歧杆菌属特异性引物 g-Bifid-F^[13]: 5'-CTCCTGGAAACGGGTGG-3', 反向引物为通用引物 1510r: 5'-ACGG(C/T)TACCTTGTTACGACTT-3', g-Bifid-F 的双歧杆菌属特

表 1 试验菌种			
Table 1 Experimental strains			
菌属	来源	菌属	来源
Species	Strain designation	Species	Strain designation
青春双歧杆菌	ATCC 15703 , ATCC 15705	植物乳杆菌	ATCC 14917
<i>Bifidobacterium adolescentis</i>		<i>Lactobacillus plantanum</i>	
两歧双歧杆菌	KCTC 3202 , ATCC 29521	嗜酸乳杆菌	ATCC 314
<i>Bifidobacterium bifidum</i>		<i>Lactobacillus acidophilus</i>	
乳双歧杆菌	ATCC SD5219 , DSM 10140	鼠李糖乳杆菌	ATCC 53103
<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i>		<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	
婴儿双歧杆菌	ATCC 6069 , ATCC 15697	嗜热链球菌	ATCC 19258
<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>infantis</i>		<i>Streptococcus thermophilus</i>	
长双歧杆菌	ATCC 15697 , ATCC 15707	金黄色葡萄球菌	ATCC 12600
<i>Bifidobacterium longum</i>		<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	
枯草芽孢杆菌	ATCC 49822	大肠杆菌	O157:H7
<i>Bacillus subtilis</i>		<i>Escherichia coli</i>	

异性已采用 NCBI BLAST 确证。本研究目的在于建立多相 T-RFLP，在已建立的乳酸杆菌 T-RFLP 技术中使用的是 6-FAM 荧光物质标记，因此本试验选择荧光物质 HEX 标记引物 g-Bifid-F 用于双歧杆菌属的 T-RFLP 检测。Liu 等^[14]证明 HEX 的荧光标记具有特异性，且引物二聚体干扰较少。

选用两歧双歧杆菌种特异性引物^[15]BiBIF-1 (5'-CCACATGATCGCATGTGATTG-3') 和 BiBIF-2 (5'-CCGAAGGCTTGCTCCCAAA-3')，婴儿双歧杆菌种特异性引物^[15]BiINF-1 (5'-TTCCAGTTGATCGCATGGTC-3')和 BiINF-2 (5'-GGAAACCCCATCTCTGGGAT-3')，用于合生元产品中的双歧杆菌种类及含量的检测。以上引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。

1.3 细菌基因组 DNA 的提取

将双歧杆菌标准菌株挑取单菌落接种于 MRS 液体培养基中，37℃厌氧培养 24 h 后离心取菌体用于 DNA 的提取。取 100 mg 合生元产品用无菌生理盐水溶解后用于 DNA 的提取。DNA 提取试剂盒由北京天根生物科技有限公司提供。

1.4 PCR 扩增反应

根据 PCR 反应试剂盒(TaKaRa)说明书，反应体系采用 50 μL，模板量为 100 ng，阴性对照用 ddH₂O 代替。PCR 扩增条件为：94℃ 3 min；94℃

45 s，58℃ 30 s，72℃ 1 min，30 个循环；72℃ 3 min。PCR 反应结束后用 PCR 产物纯化试剂盒(北京天根生物科技有限公司)纯化产物。

1.5 限制性酶切消化

本研究利用 BLAST 和 DNASTar 软件，用 20 种限制性内切酶分别模拟酶切双歧杆菌的 PCR 片段，最终选择 *Hae* III 和 *Alu* I 作为双歧杆菌的特异性限制性内切酶。酶切体系根据酶(TaKaRa)说明书采用 40 μL，PCR 产物 6 μL，在 37℃ 消化 6 h，反应完成后，*Hae* III 在 80℃ 水浴中 20 min 失活，*Alu* I 在 65℃ 水浴中 20 min 失活。

1.6 T-RFLP 分析

酶切后的产物送至上海生工生物工程技术服务有限公司合成检测，T-RFLP 分析设备为 ABI 3730 型 DNA 分析测序仪(美国 ABI 公司)。乳酸杆菌属特异性 T-RFLP 技术参见本实验室的报道^[12]。

1.7 合生元的菌落计数

称取合生元产品 100 mg，用无菌生理盐水充分悬浮，进行梯度稀释。取不同梯度的稀释液分别涂布于 MRS 培养基(乳酸杆菌选择性培养)和 MRS (Li-Mupirocin)培养基(双歧杆菌选择性培养)中，分别置于湿度为 95%的 5% CO₂ 培养箱及厌氧盒中，37℃ 培养 48 h。观察菌落形态，计算菌落数，用 CFU/100 g 表示。

1.8 合生元产品时效性的检测

市购合生元产品,分别在新鲜购入(0 d)、室温(25 °C)贮存一个月(30 d)和两个月(60 d)这 3 个时间点,采用 T-RFLP 技术进行检测。每次取 3 个不同包装的产品做 3 个平行测试。

2 结果与分析

2.1 双歧杆菌属特异性引物

为了进一步确证双歧杆菌属特异性引物 g-Bifid-F 的特异性,本文用其结合 16S rRNA 通用引物 1510r,扩增双歧杆菌 DNA 得到长度约为 1 400 bp 的扩增产物,而扩增乳酸杆菌和大肠杆菌等非双歧杆菌都无 PCR 产物,说明该对引物能特异性地对双歧杆菌进行 PCR 扩增(图 1),PCR 准确度为 100%。

2.2 限制性消化酶切

表 2 为使用 *Hae* III 和 *Alu* I 模拟酶切各双歧杆菌 5'端片段的长度。从表 2 中可以看出 *Hae* III 酶切 *B. longum* subsp. *infantis* 和 *B. adolescentis* 的 5'端片

段的长度均为 113 bp,无法将其区分;但是 *Alu* I 酶切 *B. longum* subsp. *infantis* 和 *B. adolescentis* 的 5'端片段的长度分别为 60 bp 和 96 bp,可以成功将这两种双歧杆菌区分开来。并且 *Hae* III 和 *Alu* I 酶切同种不同株的双歧杆菌所得到的 5'端片段的长度非常接近甚至一致,比如 *Hae* III 酶切 *B. bifidum* KCTC 3202 和 *B. bifidum* ATCC 29521 的 5'端片段的长度皆为 142 bp,非常符合本研究对限制性内切酶选择的条件,以此证明了选用 *Hae* III 和 *Alu* I 两种限制性内切酶合并应用能有效区分以上的双歧杆菌种。

2.3 双歧杆菌 T-RFLP 分析检测

本研究将 5 株双歧杆菌的酶切产物纯化后进行 T-RFLP 测序。测序仪依据该 5 株菌 5'-末端荧光标记片段的大小产生了不同位置的峰。从图 2 可知,5 种双歧杆菌被内切酶 *Hae* III 消化后的末端片段长度分别是婴儿双歧杆菌(113 bp)、长双歧杆菌(113 bp)、青春双歧杆菌(113 bp)、乳双歧杆菌(115 bp)和两歧双歧杆菌(141 bp)。

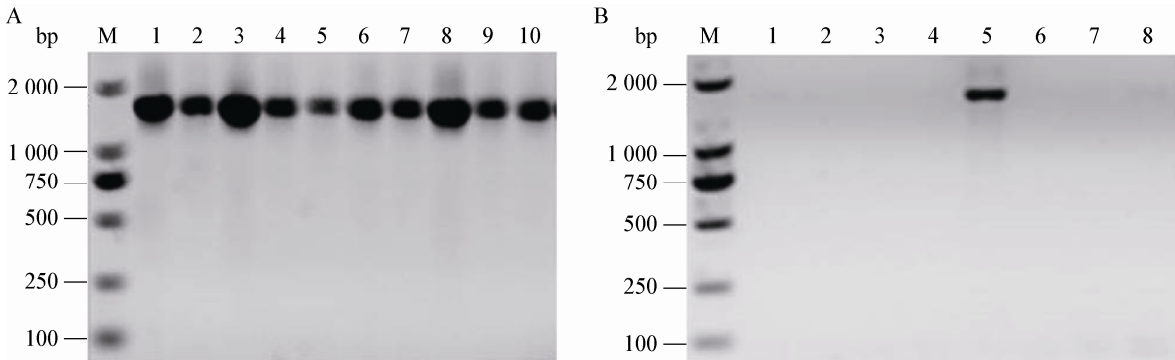


图 1 双歧杆菌属特异性的 PCR (g-Bifid-F/1510r)扩增图谱

Figure 1 Confirmation of g-Bifid-F/1510r as Bifidobacteria genus-specific primers

注:A:双歧杆菌 PCR 扩增图谱;M:DNA marker;1:青春双歧杆菌 ATCC 15703;2:青春双歧杆菌 ATCC 15705;3:两歧双歧杆菌 KCTC 3202;4:两歧双歧杆菌 ATCC 29521;5:乳双歧杆菌 ATCC SD5219;6:乳双歧杆菌 DSM 10140;7:婴儿双歧杆菌 ATCC 6069;8:婴儿双歧杆菌 ATCC 15697;9:长双歧杆菌 ATCC 15697;10:长双歧杆菌 ATCC 15707。B:长双歧杆菌与其他 7 株非双歧杆菌;M:DNA marker;1:嗜热链球菌 ATCC 19258;2:金黄色葡萄球菌 ATCC 12600;3:大肠杆菌 O157:H7;4:枯草芽孢杆菌 ATCC 49822;5:长双歧杆菌 ATCC 15697;6:植物乳杆菌 ATCC 14917;7:嗜酸乳杆菌 ATCC 314;8:鼠李糖乳杆菌 ATCC 53103。

Note: A: PCR amplicons of different *Bifidobacterium*; M: DNA marker; 1: *B. adolescentis* ATCC 15703; 2: *B. adolescentis* ATCC 15705; 3: *B. bifidum* KCTC 3202; 4: *B. bifidum* ATCC 29521; 5: *B. animalis* subsp. *lactis* ATCC SD5219; 6: *B. animalis* subsp. *lactis* DSM 10140; 7: *B. longum* subsp. *infantis* ATCC 6069; 8: *B. longum* subsp. *infantis* ATCC 15697; 9: *B. longum* subsp. *infantis* ATCC 15697; 10: *B. longum* ATCC 15707. B: PCR amplification for *Bifidobacterium longum* and 7 non-bifidobacterium strains; M: DNA marker; 1: *S. thermophilus* ATCC 19258; 2: *S. aureus* subsp. *aureus* ATCC 12600; 3: *E. coli* O157:H7; 4: *B. subtilis* ATCC 49822; 5: *B. longum* ATCC 15697; 6: *L. plantarum* ATCC 14917; 7: *L. acidophilus* ATCC 314; 8: *L. rhamnosus* ATCC 53103.

表 2 <i>Hae</i> III 和 <i>Alu</i> I 酶切各双歧杆菌 5'片段的长度		
Table 2 The 5' fragment length of <i>Bifidobacterium</i> digested by <i>Hae</i> III and <i>Alu</i> I		
菌种名称 Species	<i>Hae</i> III	<i>Alu</i> I
<i>B. longum</i> subsp. <i>infantis</i> ATCC 15697/ATCC 6069	113	60
<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> ATCC SD5219/DSM 10140	115	96
<i>B. longum</i> ATCC 15697/ATCC 15707	113	60
<i>B. adolescentis</i> ATCC 15703/ATCC 15705	113	96
<i>B. bifidum</i> KCTC 3202/ATCC 29521	142	96

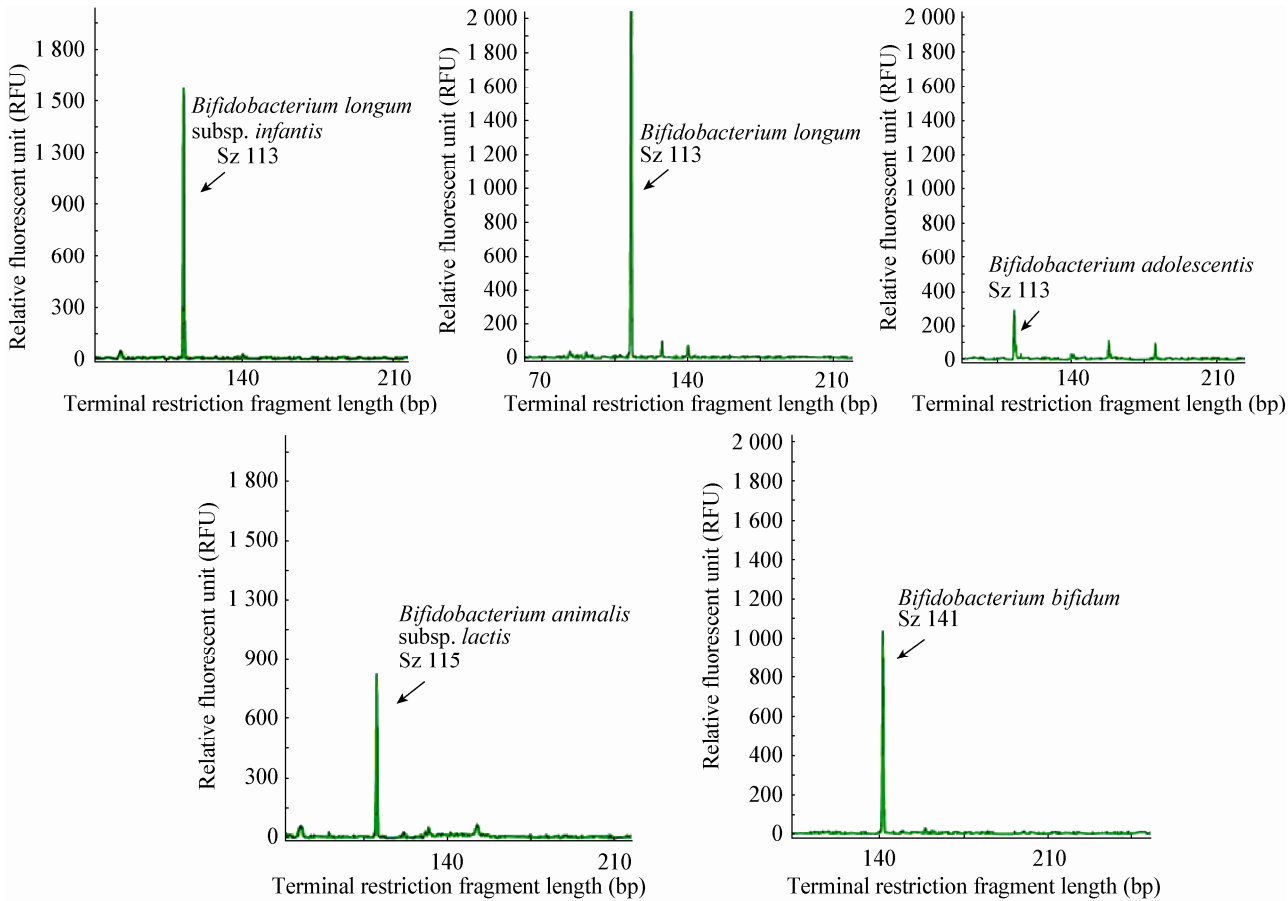


图 2 限制性内切酶 *Hae* III 消化 5 种双歧杆菌的 T-RFLP 图谱
Figure 2 T-RFLP profiles of five *Bifidobacterium* strains digested by *Hae* III

同时,将这 5 株双歧杆菌的混合菌液提取 DNA 后 PCR 扩增和限制性酶切分析,得到混合样品的 T-RFLP 峰图。图 3A 是限制性内切酶 *Hae* III 消化 5 株混合双歧杆菌的 T-RFLP 图谱,一共有 3 个不同位置的峰;图 3B 是限制性内切酶 *Alu* I 消化 5

株混合双歧杆菌的 T-RFLP 图谱,一共有 2 个不同位置的峰,这个结果与表 3 吻合。其中由于婴儿双歧杆菌是长双歧杆菌的亚种,所以在两张图中得到的峰是一致的。从图 3A 可以看出乳双歧杆菌和两歧双歧杆菌拥有自己特殊的末端片段长度,所以运

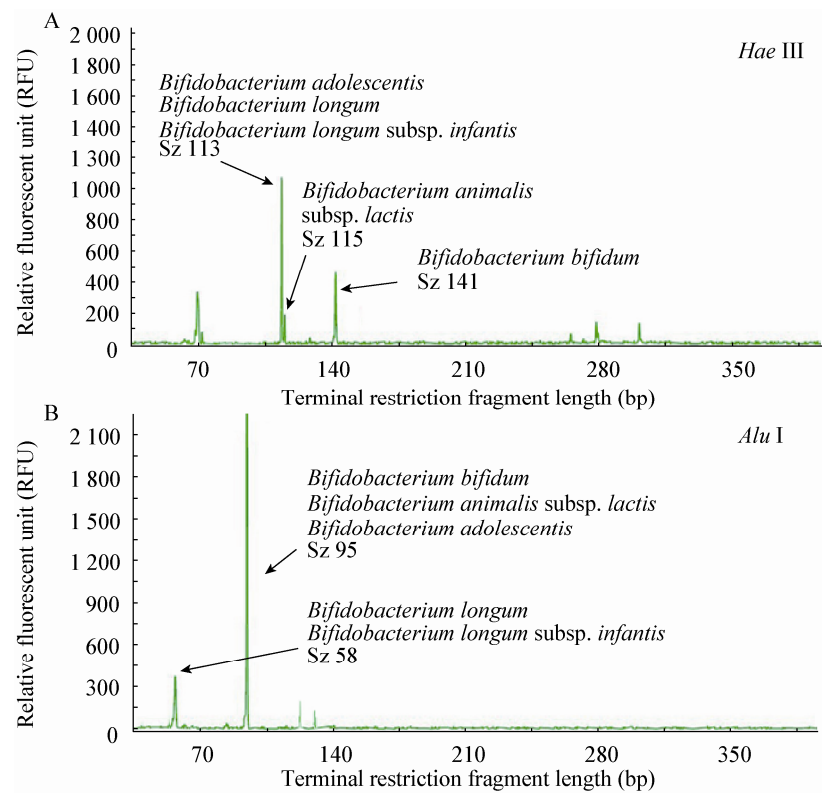


图 3 限制性内切酶 *Hae* III (A)和 *Alu* I (B)消化 5 株混合双歧杆菌的 T-RFLP 图谱
Figure 3 T-RFLP analysis of the mixture of five *Bifidobacterium* strains gene digested by *Hae* III (A) and *Alu* I (B)

用 T-RFLP 技术能够快速、高效地判断混合样品中是否含有这两种菌,并且从峰值的高度可以直观地得到菌株的含量。以此为例,本研究可使用 T-RFLP 技术对人肠道内这 5 种优势双歧杆菌进行特异性检测,*Hae* III 和 *Alu* I 的结合使用能更有效地区分以上 5 个双歧杆菌属。

2.4 合生元的菌落计数结果分析

选取新鲜购入、室温贮存一个月和两个月的合生元产品在 MRS 培养基和 MRS (Li-Mupirocin)培养基上进行菌落计数。培养法采用 MRS 培养基(5% CO₂)与 MRS (Li-Mupirocin)培养基(厌氧)可分别计数嗜酸乳杆菌与双歧杆菌,但无法区分两歧双歧杆菌和婴儿双歧杆菌。计数结果见图 4,随着保存时间的延长,活菌数呈递减趋势。

2.5 合生元 T-RFLP 分析检测

将双歧杆菌属特异性 T-RFLP 技术与本实验室已搭建的乳酸杆菌属特异性 T-RFLP 技术相结合,

建立多相 T-RFLP 技术,因采用不同的荧光标记(6-FAM 与 HEX),仅一次基因扫描即可检测两种不同菌属的末端。图 5 是 *Hae* III 限制性内切酶消化新鲜购入的合生元产品的 T-RFLP 图谱,可证实合生元产品中确实含有包装上所标示的 3 种益生菌。

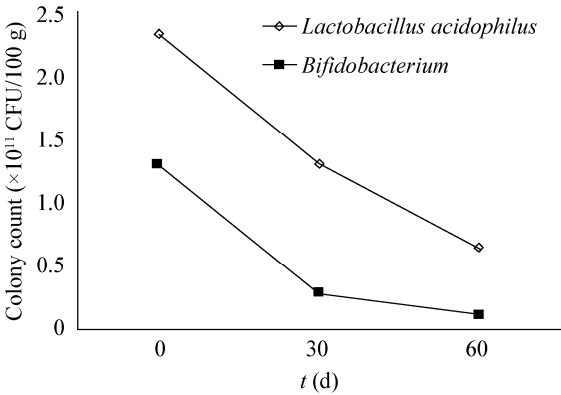


图 4 嗜酸乳杆菌和双歧杆菌在 3 个时间点的计数
Figure 4 *L. acidophilus* and *Bifidobacterium* plate count at three time points

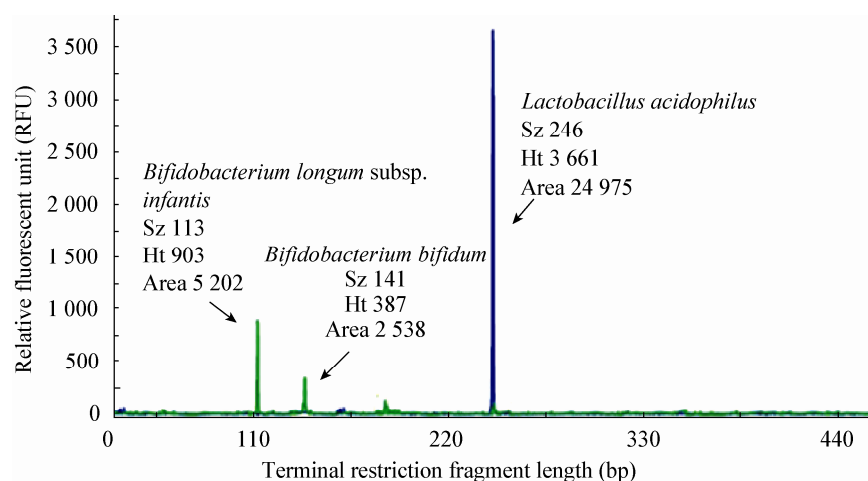


图5 *Hae* III 限制性消化酶切合生元产品的 T-RFLP 图谱
Figure 5 T-RFLP analysis of the Biostime digested by *Hae* III

其中,由婴儿双歧杆菌峰值(903)、两歧双歧杆菌峰值(387)、嗜酸乳杆菌峰值(3 361)计算可得嗜酸乳杆菌的量约为两种双歧杆菌总量的 2.5 倍,与平板计数结果[嗜酸乳杆菌(2.3×10^{11} CFU/100 g)的量约为双歧杆菌(1.3×10^{11} CFU/100 g)量的 2 倍]基本吻合。

因合生元没有标示其产品中两歧双歧杆菌和婴儿双歧杆菌的各自含量,本试验通过两种双歧杆菌的种特异性 PCR 鉴定和 T-RFLP 技术两个方面来检测其两种双歧杆菌的组成及含量。婴儿双歧杆菌种特异性引物(BiBIF-1 & BiBIF-2, 分别位于大肠杆菌 16S rRNA 基因区序列的第 184–204 和第 475–442 位碱基上)与两歧双歧杆菌种特异性引物(BiINF-1 & BiINF-2, 分别位于大肠杆菌 16S rRNA 基因区序列的第 182–201 和第 1 027–1 007 位碱基上)均由 Matsuki 等^[15]设计。稀释适当梯度的合生元产品涂布于 MRS (Li-Mupirocin)培养基中培养后,随机挑取 100 个单菌落,分别用这两对引物进行 PCR 检测,显示婴儿双歧杆菌的数量(73 个)约为两歧双歧杆菌的数量(27 个)的 2.7 倍。

T-RFLP 检测计算可得婴儿双歧杆菌的量约为两歧双歧杆菌的量的 2.3 倍,与双歧杆菌种特异性 PCR 结果(婴儿双歧杆菌/两歧双歧杆菌=2.7)也基本吻合。

图6 直观地显示了嗜酸乳杆菌、婴儿双歧杆菌

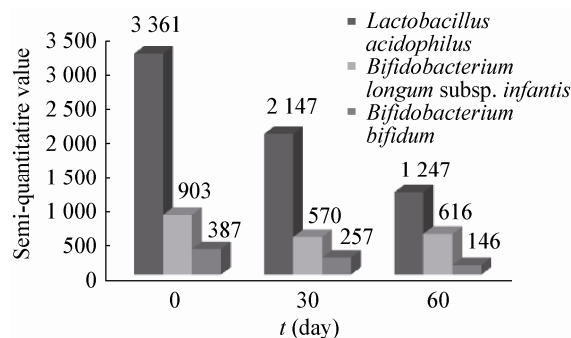


图6 嗜酸乳杆菌、婴儿双歧杆菌和两歧双歧杆菌经 T-RFLP 检测在 3 个时间段的半定量值

Figure 6 The semi-quantitative value of *L. acidophilus*, *B. longum subsp. infantis* and *B. bifidum* by T-RFLP analysis in three time points

和两歧双歧杆菌经 T-RFLP 检测分别在新鲜购入(0 d)、室温贮存一个月(30 d)和两个月(60 d)的半定量值。可以看出,经检测,合生元产品在货架期内各成分含量较为稳定,质量表现较好。

3 讨论

本研究使用的引物 g-Bifid-F 为由 Matsuki 等^[13]设计的源于 16S rRNA 基因区序列第 153–169 位碱基上的双歧杆菌属特异性引物, Matsuki 等将 g-Bifid-F 与双歧杆菌和非双歧杆菌的序列做了 NCBI BLAST 比对,显示了 g-Bifid-F 引物序列仅

对双歧杆菌属高度特异,而对于乳酸杆菌、芽孢杆菌等其他多种非双歧杆菌差异性较大。本文使用 g-Bifid-F 与 16S rRNA 通用引物 1510r 配对,能特异地 PCR 扩增本实验室保存的双歧杆菌标准菌株,说明 g-Bifid-F/1510r 对双歧杆菌特异性强,适用于双歧杆菌的 T-RFLP 种群检测。同时,限制性内切酶 *Hae* III 和 *Alu* I 的组合能有效地区分不同的双歧杆菌,所以它们的联合使用让双歧杆菌 T-RFLP 检测技术得到了更好的优化,成功搭建了双歧杆菌的 T-RFLP 分子生态学技术检测平台。

此外,本研究选用市购益生菌产品——合生元,将双歧杆菌属特异性 T-RFLP 技术与本实验室已建立的乳酸杆菌属特异性 T-RFLP 技术相结合建立多相 T-RFLP 技术,同时采用传统微生物培养方法,分别对产品中益生菌的种类及含量进行检测。T-RFLP 技术的应用成功实现了对益生菌产品合生元成分的定性及半定量分析。经检测,合生元产品中含有包装所标示的 3 种益生菌。在含量方面,产品标示中嗜酸乳杆菌的含量比双歧杆菌的含量高出一个数量级,但检测得出嗜酸乳杆菌的量是两种双歧杆菌总量的 2.5 倍,与平板计数的结果基本吻合。同时,对两种双歧杆菌的含量也进行了测定,在 MRS (Li-Mupirocin) 培养基上随机挑取 100 个单菌落,经鉴定婴儿双歧杆菌是两歧双歧杆菌的 2.7 倍,这与 T-RFLP 检测合生元的结果也基本吻合。再者,本试验对合生元产品的时效性进行了检测,成功实现了对该产品成分的半定量分析,体现了产品质量在时间上的差异。首先采用了传统微生物培养方法,选用了 MRS 培养基和 MRS (Li-Mupirocin) 培养基对合生元进行平板计数和分析。平板计数结果均与用 T-RFLP 技术检测所得的半定量数据吻合。经检测,室温贮存一个月后的合生元与新鲜购入时相比,3 种菌的含量均有下降,但下降的比值比较相近;两个月后的合生元与一个月前相比,3 种菌的含量均有所下降,嗜酸乳杆菌的量较双歧杆菌下降得比较明显。此外,本试验 PCR 的灵敏度可达到 10^2 CFU (新鲜菌悬液)和 10^3 CFU (益生

菌粉剂产品)。因为本方法采用的是常规 PCR 反应, T-RFLP 峰值只是反映各菌群的半定量值,因此检测的回收率无法确定。据此,成功实现了应用 T-RFLP 技术平台对益生菌产品时效性的检测。

综上所述,本研究建立的双歧杆菌属特异性 T-RFLP 技术能够对人肠道中优势双歧杆菌菌群的变化进行快速监控;同时,建立的多相 T-RFLP 技术能够对乳酸杆菌群与双歧杆菌群同时进行快速监控,并成功应用于益生菌产品的快速监控。但由于本文只选用了人源性双歧杆菌进行检测,该技术是否适用于动物肠道或环境微生物的双歧杆菌检测还需进行深入研究。

参 考 文 献

- [1] Tannock GW. Studies of the intestinal microflora: a prerequisite for the development of probiotics[J]. International Dairy Journal, 1998, 8(5/6): 527-533.
- [2] Ballongue J. Bifidobacteria and probiotic action[A]//Salminen S, von Wright A, Ouwehand A, editors. Lactic acid Bacteria Microbiological and Functional Aspects[M]. New York: Marcel Dekker Inc., 2004: 67-124.
- [3] Cheikhyssef A, Pogori N, Chen H, et al. Antimicrobial activity and partial characterization of bacteriocin-like inhibitory substances (BLIS) produced by *Bifidobacterium infantis* BCRC 14602[J]. Food Control, 2009, 20(6): 553-559.
- [4] 朱俊晨,李世敏,魏小青,等. 双歧杆菌对人体的生理作用及研究进展[J]. 中国微生态学杂志, 2000, 12(1): 53-55.
- [5] 张勇,刘勇,张和平. 世界益生菌产品研究和发展趋势[J]. 中国微生态学杂志, 2009, 21(2): 185-193.
- [6] Lukow T, Dunfield PF, Liesack W. Use of the T-RFLP technique to assess spatial and temporal changes in the bacterial community structure within an agricultural soil planted with transgenic and non-transgenic potato plants[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2000, 32(3): 241-247.
- [7] Dunbar J, Ticknor LO, Kuske CR. Phylogenetic specificity and reproducibility and new method for analysis of terminal restriction fragment profiles of 16S rRNA genes from bacterial communities[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2001, 67(1): 190-197.
- [8] Braker G, Ayala-Del-Rio HL, Devol AH, et al. Community structure of denitrifiers, bacteria, and archaea along redox gradients in Pacific Northwest marine sediments by terminal restriction fragment length polymorphism analysis of amplified nitrite reductase (*nirS*) and 16S rRNA genes[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2001, 67(4): 1893-1901.

- [9] Inagaki F, Sakihama Y, Inoue A, et al. Molecular phylogenetic analyses of reverse-transcribed bacterial rRNA obtained from deep-sea cold seep sediments[J]. *Environmental Microbiology*, 2002, 4(5): 277-286.
- [10] Nüsslein B, Chin KJ, Eckert W, et al. Evidence for anaerobic syntrophic acetate oxidation during methane production in the profundal sediment of subtropical Lake Kinneret (Israel)[J]. *Environmental Microbiology*, 2001, 3(7): 460-470.
- [11] Dorigo U, Volatier L, Humbert JF. Molecular approaches to the assessment of biodiversity in aquatic microbial communities[J]. *Water Research*, 2005, 39(11): 2207-2218.
- [12] 张思璐, 刘云霄, 张浩琪, 等. 属特异性 T-RFLP 技术用于乳酸杆菌的群落分析[J]. *微生物学通报*, 2012, 39(8): 1179-1189.
- [13] Matsuki T, Watanabe K, Fujimoto J, et al. Development of 16S rRNA-gene-targeted group-specific primers for the detection and identification of predominant bacteria in human feces[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68(11): 5445-5451.
- [14] Liu WT, Marsh TL, Cheng H, et al. Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, 63(11): 4516-4522.
- [15] Matsuki T, Watanabe K, Tanaka R, et al. Distribution of bifidobacterial species in human intestinal microflora examined with 16S rRNA-gene-targeted species-specific primers[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, 65(10): 4506-4512.

(上接 p.2524)

征 稿 简 则

3.3 摘要写作注意事项

- 3.3.1 英文摘要: 1) 建议使用第一人称, 以此可区分研究结果是引用文献还是作者得出的; 2) 建议用主动语态, 被动语态表达拖拉模糊, 尽量不用, 这样可以避免长句, 以求简单清晰; 3) 建议使用过去时态, 要求语法正确, 句子通顺; 4) 英文摘要的内容应与中文摘要一致, 但可比中文摘要更详尽, 写完后务必请英文较好且专业知识强的专家审阅定稿后再返回编辑部。5) 摘要中不要使用缩写语, 除非是人人皆知的, 如: DNA, ATP 等; 6) 在英文摘要中, 不要使用中文字体标点符号。
- 3.3.2 关键词: 应明确、具体, 一些模糊、笼统的词语最好不用, 如基因、表达……

4 特别说明

4.1 关于测序类论文

凡涉及测定 DNA、RNA 或蛋白质序列的论文, 请先通过国际基因库 EMBL (欧洲) 或 GenBank (美国) 或 DDBJ (日本), 申请得到国际基因库登录号 (Accession No.) 后再投来。

4.2 关于版权

4.2.1 本刊只接受未公开发表的文章, 请勿一稿两投。

4.2.2 凡在本刊通过审稿、同意刊出的文章, 所有形式的 (即各种文字、各种介质的) 版权均属本刊编辑部所有。作者如有异议, 敬请事先声明。

4.2.3 对录用的稿件编辑部有权进行文字加工, 但如涉及内容的大量改动, 将请作者过目同意。

4.2.4 文责自负。作者必须保证论文的真实性, 因抄袭剽窃、弄虚作假等行为引发的一切后果, 由作者自负。

4.3 审稿程序及提前发表

4.3.1 来稿刊登与否由编委会最后审定。对不录用的稿件, 一般在收稿 2 个月之内通过 E-mail 说明原因, 作者登陆我刊系统也可查看。稿件经过初审、终审通过后, 作者根据编辑部返回的退修意见进行修改补充, 然后以投稿时的用户名和密码登陆我刊系统上传修改稿, 待编辑部复审后将给作者发稿件录用通知单, 稿件按照投稿先后排队发表。

4.3.2 对投稿的个人和单位一视同仁。坚持文稿质量为唯一标准, 对稿件采取择优先登的原则。如作者要求提前发表, 请在投稿的同时提出书面报告, 说明该研究成果的重要性、创新性、竞争性和提前发表的必要性, 经过我刊的严格审查并通过后, 可予提前刊出。

5 发表费及稿费

论文一经录用, 将在发表前根据版面收取一定的发表费并酌付稿酬、赠送样刊。

6 联系方式

地址: 北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号中国科学院微生物研究所《微生物学通报》编辑部(100101)

Tel: 010-64807511

E-mail: tongbao@im.ac.cn

网址: <http://journals.im.ac.cn/wwxtbcn>