

属特异性 T-RFLP 技术用于乳酸杆菌的群落分析

张思璐¹ 刘云霄¹ 张浩琪¹ CHIN James² 吴希阳^{1*}

(1. 暨南大学 食品科学与工程系 广东 广州 510632)

(2. Immunology and Microbiology, Elizabeth Macarthur Agriculture Institute, NSW Department of Primary Industries, Camden, NSW 2570, Australia)

摘要: 【目的】设计乳酸杆菌属特异性 T-RFLP 技术(末端限制性片段长度多态性分析)对 14 株乳酸杆菌进行分型。【方法】采用源于 16S-23S rRNA 基因间隔区序列的乳酸杆菌属特异性引物 LAB-rev, 乳酸杆菌的属特异性引物, 6-FAM 荧光标记后结合 16S 上游通用引物 7f 用于乳酸杆菌的 PCR 扩增。【结果】选取 *Hae* III 和 *Hha* I 进行限制性酶切, 最后对酶切后的产物末端测序得到 T-RFLP 峰谱图, 该图谱能够快速准确地对不同种的乳酸杆菌进行定性、定量的分析。【结论】实验成功搭建 T-RFLP 技术用于微生态环境中乳酸杆菌检测的平台, 对于在功能性食品、乳酸饮料和药物对肠道微生态的影响及菌种鉴定等领域有重大意义。

关键词: 乳酸杆菌, T-RFLP 技术, 属特异性引物

Development of a genus-specific T-RFLP technique for differentiating *Lactobacillus* community

ZHANG Si-Lu¹ LIU Yun-Xiao¹ ZHANG Hao-Qi¹
CHIN James² WU Xi-Yang^{1*}

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

(2. Immunology and Microbiology, Elizabeth Macarthur Agriculture Institute, NSW Department of Primary Industries, Camden, NSW 2570, Australia)

Abstract: [Objective] To develop a *Lactobacillus* genus-specific T-RFLP technique for

基金项目: 暨南大学科研培育与创新基金项目(国际及港澳台合作项目, No. 21611614)

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

收稿日期: 2011-11-20; 接受日期: 2012-02-20

differentiating 14 *Lactobacillus* strains. [Methods] A *Lactobacillus* genus-specific primer (LAB-rev) was firstly designed based on the sequence variation of bacterial 16S-23S space region, which was then labeled with 6-Carboxyfluorescein (6-FAM), followed by PCR with a 16S universal primer (7f). The PCR amplicon was then digested by restriction enzyme *Hae* III and *Hha*I before terminal sequencing by AB3730 Gene Scan to achieve T-RFLP profiles. [Results] Results showed that this technique is more specific than the traditional T-RFLP using universal primers, which can be used to detect and quantitate *Lactobacillus* of 14 different species in this study. [Conclusion] This technique has a great potential of application in investigating lactobacillus communities, evaluating the probiotic function of functional food, dairy drinks and medicine on intestinal micro-ecological environment.

Keywords: *Lactobacillus* community, T-RFLP technique, Genus-specific primers

肠道菌群种类繁多, 如何分析其种类组成是研究其与人体健康关系的关键。而乳酸杆菌是人体肠道中最重要的益生菌之一, 乳酸杆菌在胃肠道菌群平衡调节中发挥重要作用^[1]。肠道乳酸杆菌可分解糖产酸, 抑制致病菌及腐败菌的繁殖, 因此人体肠道中乳酸杆菌的数量和种类在某种程度上反应了一个人的健康状况。

传统的乳酸杆菌分析方法建立在微生物分离、纯种培养的基础上, 如 MRS 培养基培养和生化鉴定, 耗时长, 且不能同时检测出多种乳酸杆菌, 并需对操作人员进行严格的训练^[2], 严重滞后了对肠道生态监控以及评估益生菌产品的迫切需要。近年来分子生物学技术已被广泛地应用于微生物群落结构分析, 主要的研究方法包括: 聚合酶链式反应(Polymerase chain reaction, PCR)^[3-4]、荧光原位杂交法(Fluorescence in situ hybridization, FISH)^[5-8]、限制性酶切片段长度多态性分析法(Restriction fragment length polymorphism, RFLP)^[9]、变性梯度凝胶电泳法(Denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE)^[10]和末端限制性片段长度多态性分析(Terminal restriction fragment length polymorphism, T-RFLP)^[11]等。

T-RFLP 技术是根据实验目的选取一对荧光

标记的引物扩增目的片段, 利用限制性内切酶酶切后会产生不同片段大小的产物, 通过测序仪检测。由于不同长度的末端限制性片段代表不同的细菌, 也就是说一种末端限制性片段至少代表一种细菌, 这些末端标记的片段可以反映微生物群落组成情况^[12-15], 其具有分辨率高, 输出定量的数据结果, 可实现自动化等优点^[16]。本研究致力于搭建 T-RFLP 分子生态学技术用于微生态系统中乳酸杆菌检测的平台。常规的 T-RFLP 技术选用 16S rRNA 通用引物进行 PCR 扩增, 这种方法对于微生态的优势菌群存在 PCR 趋向性, 而非优势菌群可能会漏检。本研究采用新型改良的 T-RFLP 技术, 设计乳酸杆菌属特异性引物, 首先选择性地扩增所有乳酸杆菌属, 然后依据其 16S rRNA 序列的差异性采用不同的酶切进行乳酸杆菌种分型。酶切片段通过 T-RFLP 检测出不同种的乳酸杆菌, 用来系统分析微生态中乳酸杆菌的分布。

1 材料与方法

1.1 实验菌种、主要试剂和设备

1.1.1 实验菌种: 搜集的乳酸杆菌的典型菌株和非乳酸杆菌等如表 1 所示。

表 1 实验菌株
Table 1 Experimental strains

| 名称 Species | 来源 Strain designation |
|----------------------------------------------------------------|----------------------------------|
| 嗜酸乳杆菌 <i>Lactobacillus acidophilus</i> | ATCC 314, NCDO 1748 |
| 植物乳杆菌 <i>Lactobacillus plantanum</i> | ATCC 14917 |
| 鼠李糖乳杆菌 <i>Lactobacillus rhamnosus</i> | ATCC 53103, ATCC9595 |
| 副干酪乳杆菌 <i>Lactobacillus</i> subsp. <i>paracasei</i> | ATCC25598 |
| 德氏乳杆菌乳亚种 <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> | ATCC 4797 |
| 詹氏乳杆菌 <i>Lactobacillus jensenii</i> | ATCC 25258 |
| 约氏乳杆菌 <i>Lactobacillus johnsonii</i> | ATCC 33200 |
| 加氏乳杆菌 <i>Lactobacillus gasseri</i> | ATCC33323, ATCC 19992, NCDO 2233 |
| 唾液乳杆菌 <i>Lactobacillus salivarius</i> | ATCC 11741 |
| 干酪乳杆菌 <i>Lactobacillus casei</i> | ATCC 393 |
| 青春双歧杆菌 <i>Bifidobacterium adolescentis</i> | ATCC 15703 |
| 短双歧杆菌 <i>Bifidobacterium breve</i> | ATCC 15700 |
| 两双歧杆菌 <i>Bifidobacterium bifidum</i> | KCTC 3202 |
| 长双歧杆菌 <i>Bifidobacterium longum</i> | ATCC 15697 |
| 地衣芽孢杆菌 <i>Bacillus licheniformis</i> | ATCC 12759 |
| 枯草芽孢杆菌 <i>Bacillus subtilis</i> | ATCC 49822 |
| 大肠杆菌 <i>Escherichia coli</i> | O157:H7, RGR13 |
| 嗜热链球菌 <i>Streptococcus thermophilus</i> | ATCC 19258 |
| 无害利斯特菌 <i>Listeria innocua</i> | ATCC 33090 |
| 粪肠球菌 <i>Enterococcus faecalis</i> | JCM 5803 |
| 金黄色葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> | ATCC 12600 |

1.1.2 主要试剂和培养基: 细菌基因组 DNA 提取试剂盒为天根生化公司产品; PCR 反应体系所需试剂 *Taq*TM DNA 聚合酶(5 U/ μ L)、dNTP MasterMix (250 μ mol/L)、MgCl₂、10 \times PCR 缓冲液、100 bp DNA ladder marker、200 bp DNA ladder marker、6 \times Loading buffer、*Hae* III 和 *Hha* I 限制性内切酶等均为大连宝生物工程有限公司产品; 电泳级琼脂糖为上海鼎国生物技术有限公司的产品; 引物由 Invitrogen 公司合成; PCR 产物回收试剂盒为普博欣公司的产品。

MRS 琼脂培养基(广东环凯微生物科技有限公司): MRS 本体 64.3 g, 琼脂 15 g, 蒸馏水 1 000 mL。

调 pH 7.2 后混匀, 分装三角瓶中, 1×10^5 Pa 灭菌 15 min 备用。

1.1.3 主要仪器: SW-CJ-1B 型单人单面净化工作台, 苏州净化设备有限公司; 手提式蒸汽压力灭菌锅, 上海华线医用核子仪器有限公司; PYX-150S-A 生化培养箱, 广州市正一科技有限公司; PHS-3C 台式 PH 计, 上海精科实业有限公司; HH-4 恒温水浴锅, 江苏金坛市宏华仪器厂; ZP-200 振荡器, 江苏海门市麒麟医用仪器厂; 90-2 型定时恒温磁力搅拌器, 成都一科仪器设备有限公司; 可调移液器, 上海热电仪器有限公司; GT16-3 高速离心机, 北京时代北利离心机有限

公司; Mastercycler pro 梯度 PCR 仪, 德国艾本德 Eppendorf 公司; JY600+型电泳仪, 北京君意东方电泳设备有限公司; Infinity-3026WC/26M 凝胶成像仪, 环球分析测试仪器公司。

1.2 细菌基因组 DNA 提取

按照传统的微生物培养方法分别培养表 1 中的实验菌株。菌株在液体培养基增菌培养 24 h 后, 取 1 mL 菌液用于 DNA 的提取。选用细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取 DNA, 参照说明书的要求操作。

1.3 引物设计

本研究选用正向引物为通用引物 7f, 序列为 5'-AGAGTTTGAT(C/T)(A/C)TGGCTCAG-3', 反向引物为乳酸杆菌特异性引物 LAB-rev, 序列为 5'-CTCAAACTAAACAAAGTTTC-3', LAB-rev 的乳酸杆菌属特异性采用 NCBI BLAST search 以及对不同种的乳酸杆菌和非乳酸杆菌标准菌株的 PCR 来确证。

1.4 PCR 扩增反应

PCR 扩增反应体系采用 50 μ L, 模板量为 2 μ L, 阴性对照用 ddH₂O 代替模板 DNA。PCR 扩增条件为: 94 $^{\circ}$ C 5min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 52 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 2 min, 共 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。PCR 反应完成后用 PCR 产物回收试剂盒纯化产物。

1.5 限制性酶切消化

选用 *Hae* III 和 *Hha* I 作为实验的限制性内切酶。酶切体系采用 40 μ L, PCR 产物为 6 μ L, 在 37 $^{\circ}$ C 消化 6 h, 反应完成后, *Hae* III 在 80 $^{\circ}$ C 水浴中 20 min 失活, *Hha* I 在 65 $^{\circ}$ C 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检测, T-RFLP 分析设备为 AB3730 型 DNA 分析测序仪(美国 ABI 公司)。

2 结果

2.1 乳酸杆菌属特异性引物

LAB-rev 为源于 16S-23S rRNA 基因间隔区序列的乳酸杆菌属特异性引物, 由 Dubernet 等报道, 文中将反向引物 LAB-rev 与乳酸杆菌和非乳酸杆菌的序列做了比对^[17], 显示了 LAB-rev 引物序列仅对乳酸杆菌属高度保守, 而对于其他非乳酸杆菌种属的差异性较大无法进行 PCR 扩增。本研究设计将 LAB-rev 结合 16S 通用引物 7f 用于特异性地扩增乳酸杆菌属菌株, 然后根据其种间的差异性选择内切酶进行 T-RFLP 末端序列分型。

为了进一步确证引物的特异性, 本研究以嗜酸乳杆菌、植物乳杆菌等 14 种乳酸杆菌的基因组 DNA 作为目的扩增片段, 用荧光标记的通用引物 7f-FAM 和乳酸杆菌特异性引物 LAB-rev 进行 PCR 扩增, 图 1 显示所有乳酸杆菌均有扩增产物, 扩增长度约为 1 700 bp 左右, 而双歧杆菌和大肠杆菌等 12 种非乳酸杆菌都无 PCR 产物(图 2), 说明该对引物能特异性地对乳酸杆菌进行 PCR 扩增。

2.2 荧光标记物的选择

常用的荧光物质有 TET^[18]、HEX^[11]、6-FAM^[19]等。本研究以嗜酸乳杆菌梯度稀释后的 DNA (10、1、0.1、0.01、0.001 ng/ μ L)作模板来比较 4 种不同荧光物质 FAM、VIC、PET 和 NED 标记引物对 PCR 扩增的灵敏性。图 3 为不同荧光物质标记引物 7f 后的 PCR 扩增图谱, 从图中可知, 4 种不同荧光物质标记后嗜酸乳杆菌的 PCR 扩增条带(约 1 700 bp, 浓度从大到小)均未发生变化, 条带清晰可见。因此, 该 4 种荧光物质均适合用于乳酸杆菌的 PCR 扩增标记。相比较而言, 荧光物质 PET 和 NED 比 FAM 和 VIC 多出很多小片段的引物二聚体, 因此本研究选择最少引物二聚体干扰的荧光物质 FAM 标记引物 7f (5'-FAM 标记)用于 T-RFLP 检测。

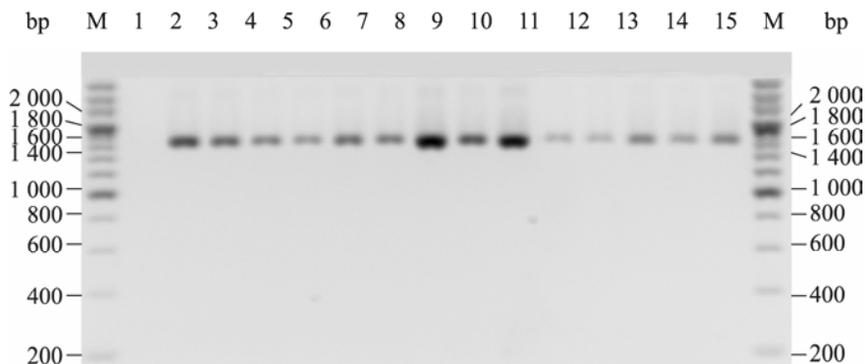


图 1 乳酸杆菌 PCR 扩增图谱
Fig. 1 PCR amplicons of 14 different Lactobacilli

注: M: DNA marker; 1: ddH₂O; 2: 嗜酸乳杆菌(ATCC 314); 3: 嗜酸乳杆菌(NCDO 1748); 4: 植物乳杆菌(ATCC 14917); 5: 鼠李糖乳杆菌(ATCC 53103); 6: 鼠李糖乳杆菌(ATCC9595); 7: 副干酪乳杆菌(ATCC 25598); 8: 德氏乳杆菌乳亚种(ATCC 4797); 9: 詹氏乳杆菌(ATCC 25258); 10: 约氏乳杆菌(ATCC 33200); 11: 加氏乳杆菌(ATCC 19992); 12: 唾液乳杆菌(ATCC 11741); 13: 加氏乳杆菌(ATCC33323); 14: 加氏乳杆菌(NCDO 2233); 15: 干酪乳杆菌(ATCC 393).

Note: M: DNA marker; 1: ddH₂O; 2: *L. acidophilus* (ATCC 314); 3: *L. acidophilus* (NCDO 1748); 4: *L. plantanum* (ATCC 14917); 5: *L. rhamnosus* (ATCC 53103); 6: *L. rhamnosus* (ATCC9595); 7: *L. paracasei* subsp. *paracasei* (ATCC 25598); 8: *L. delbrueckii* subsp. *lactis* (ATCC 4797); 9: *L. jensenii* (ATCC 25258); 10: *L. johnsonii* (ATCC 33200); 11: *L. gasseri* (ATCC 19992); 12: *L. salivarius* (ATCC 11741); 13: *L. gasseri* (ATCC33323); 14: *L. gasseri* (NCDO 2233); 15: *L. casei* (ATCC 393).



图 2 嗜酸乳杆菌及其它 12 株非乳酸杆菌 PCR 扩增图谱
Fig. 2 PCR amplification for *L. acidophilus* and 12 non-lactobacillus strains

注: M: DNA marker; 1: 青春双歧杆菌; 2: 短双歧杆菌; 3: 两双歧杆菌; 4: 长双歧杆菌; 5: 地衣芽孢杆菌; 6: 枯草芽孢杆菌; 7: 大肠杆菌(O157:H7); 8: 大肠杆菌(RGR13); 9: 嗜热链球菌; 10: 无害利斯特菌; 11: 粪肠球菌; 12: 金黄色葡萄球菌; 13: 嗜酸乳杆菌; 14: ddH₂O.

Note: M: DNA marker; 1: *B. adolescentis*; 2: *B. breve*; 3: *B. bifidum*; 4: *B. Longum*; 5: *Bacillus licheniformis*; 6: *Bacillus subtilis*; 7: *E. coli* (O157:H7); 8: *E. coli* (RGR13); 9: *S. thermophilus*; 10: *Listeria innocua*; 11: *Enterococcus faecalis*; 12: *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus*; 13: *L. acidophilus*; 14: ddH₂O.

2.3 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乳酸杆菌的 PCR 片段, 最终选择 *Hae* III 和 *Hha* I 作为乳酸杆菌的特异性限制性内切酶, 表 2 为 *Hae* III 和 *Hha* I 酶切各种乳酸杆菌 5'端和 3'端片段的长度。从表中

可以看出 *Hha* I 酶切 *L. acidophilus* 和 *L. casei* 的 5'端段的长度为 596 bp 和 599 bp, 长度非常接近, 很难将其区分; 但是 *Hae* III 酶切 *L. acidophilus* 和 *L. casei* 的 5'端段的长度为 246 bp 和 328 bp, 这样就可以成功将这两种乳杆菌区分开来。并且 *Hae* III 和 *Hha* I 酶切同种不同株的乳杆菌所得到的 5'端

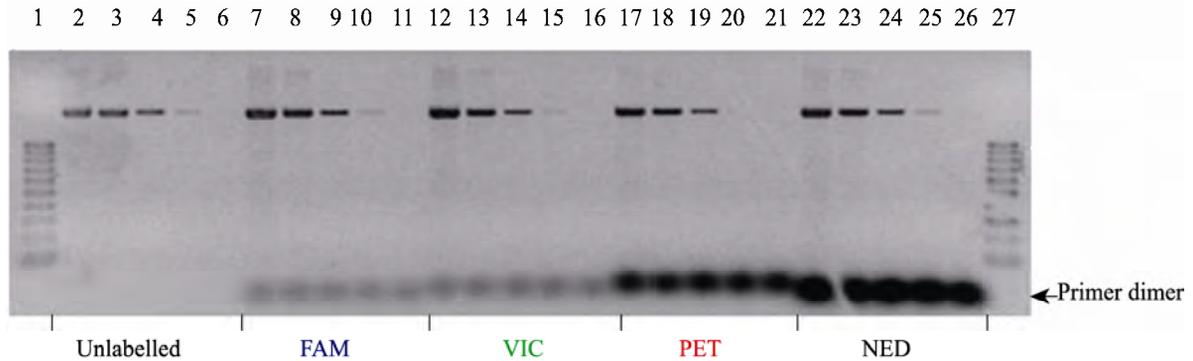


图 3 不同荧光物质标记引物 7f 后 PCR 扩增图谱

Fig. 3 Electrophoresis of *L. acidophilus* PCR products using primer 7f which was labeled with 4 different fluorophores
Note: 1, 27: DNA marker; 2-6: 7f/LAB-rev; 7-11: FAM-7f/LAB-rev; 12-16: VIC-7f/LAB-rev; 17-21: PET-7f/LAB-rev; 22-26: NED-7f/LAB-rev.

表 2 *Hae* III 和 *Hha* I 酶切各乳酸杆菌 5'和 3'片段的长度

Table 2 The 5' and 3' fragment length of different *Lactobacilli* digested by *Hae* III and *Hha* I

| 菌种名称 Species | <i>Hae</i> III | | <i>Hha</i> I | |
|---------------------------------|----------------|-------------|--------------|-------------|
| | 5'-end size | 3'-end size | 5'-end size | 3'-end size |
| <i>L. acidophilus</i> _ATCC314 | 246 | 30 | 596 | 363 |
| <i>L. brevis</i> _ATCC367 | 283 | 157 | 598 | 435 |
| <i>L. brevis</i> _RO66 | 283 | 123 | 597 | 401 |
| <i>L. casei</i> _ATCC393 | 328 | 160 | 599 | 438 |
| <i>L. casei</i> _LC3 | 328 | 157 | 599 | 435 |
| <i>L. delbrueckii</i> _ATCC4797 | 279 | 159 | 254 | 437 |
| <i>L. delbrueckii</i> _LGM2 | 278 | 156 | 253 | 434 |
| <i>L. gasseri</i> _ATCC33323 | 332 | 261 | 1 131 | 539 |
| <i>L. johnsonii</i> _ATCC33200 | 332 | 204 | 1 131 | 482 |
| <i>L. parabrevis</i> _ATCC25598 | 283 | 134 | 598 | 412 |
| <i>L. paracasei</i> _LPC1 | 328 | 157 | 599 | 435 |
| <i>L. plantarum</i> _ATCC14917 | 327 | 155 | 598 | 433 |
| <i>L. rhamnosus</i> _ATCC9595 | 327 | 141 | 285 | 419 |
| <i>L. salivarius</i> _JCM 1042 | 279 | 8 | 1 120 | 469 |
| <i>L. salivarius</i> _ATCC11741 | 279 | 170 | 1 122 | 448 |

段的长度非常接近甚至一致, 比如 *Hae* III 酶切 *L. casei*_ATCC393 和 *L. casei*_LC3 的 5' 端段的长度皆为 328 bp, 非常符合我们对限制性内切酶选择的条件, 以此证明了选用 *Hae* III 和 *Hha* I 两种限制性内切酶合并应用能有效区分各乳酸杆菌种。

从图 4A 和 B 确证, *Hae* III 和 *Hha* I 均对 1 700 bp 的 PCR 产物有多个酶切位点。图 4A 和 B 显示, 多数的乳酸杆菌种具有独特的酶切图谱, 如 1 和 2 的嗜酸乳杆菌; 但是少数种如 4、5 和 6 的鼠李糖乳杆菌与副干酪乳杆菌具有相似的酶切图谱; 某些乳酸杆菌种如植物乳杆菌和鼠李糖乳杆菌通过单一内切酶的酶切图谱难以区分, 但

是 *Hae* III 和 *Hha* I 两种酶切图谱的同时运用能够更加有效地区分。

2.4 T-RFLP 分析检测

本研究将嗜酸乳杆菌等 14 株乳杆菌(该 14 株乳杆菌包含 10 种不同的乳杆菌)的酶切产物纯化、送样进行 T-RFLP 测序。测序仪依据该 14 株菌 5'-末端荧光标记片段的大小产生了不同位置的峰, 绝大多数的乳酸杆菌拥有自己独特的末端片段长度。从图 5 可知, 4 种乳酸杆菌被内切酶 *Hae* III 消化后的末端片段长度分别是嗜酸乳杆菌(246 bp)、植物乳杆菌(327 bp)、鼠李糖乳杆菌(327 bp)和德氏乳杆菌亚种(278 bp)。

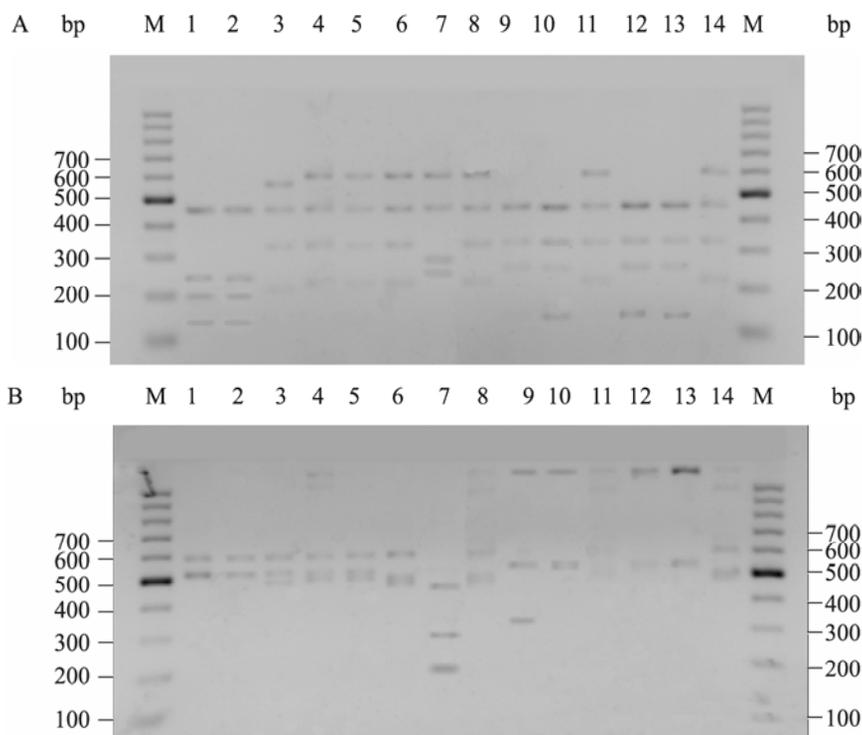


图 4 *Hae* III (A)和 *Hha* I (B)限制性消化酶切图谱

Fig. 4 *Hae* III (A) and *Hha* I (B) restriction profiles of PCR amplicons

注: M: DNA marker; 1: 嗜酸乳杆菌(ATCC 314); 2: 嗜酸乳杆菌(NCDO 1748); 3: 植物乳杆菌(ATCC 14917); 4: 鼠李糖乳杆菌(ATCC 53103); 5: 鼠李糖乳杆菌(ATCC9595); 6: 副干酪乳杆菌(ATCC 25598); 7: 德氏乳杆菌乳亚种(ATCC 4797); 8: 詹氏乳杆菌(ATCC 25258); 9: 约氏乳杆菌(ATCC 33200); 10: 加氏乳杆菌(ATCC 19992); 11: 唾液乳杆菌(ATCC 11741); 12: 加氏乳杆菌(ATCC33323); 13: 加氏乳杆菌(NCDO 2233); 14: 干酪乳杆菌(ATCC 393)。

Note: M: DNA marker; 1: *L. acidophilus* (ATCC 314); 2: *L. acidophilus* (NCDO 1748); 3: *L. plantanum* (ATCC 14917); 4: *L. rhamnosus* (ATCC 53103); 5: *L. rhamnosus* (ATCC9595); 6: *L. paracasei* subsp. *paracasei* (ATCC 25598); 7: *L. delbrueckii* subsp. *lactis* (ATCC 4797); 8: *L. jensenii* (ATCC 25258); 9: *L. johnsonii* (ATCC 33200); 10: *L. gasseri* (ATCC 19992); 11: *L. salivarius* (ATCC 11741); 12: *L. gasseri* (ATCC33323); 13: *L. gasseri* (NCDO 2233); 14: *L. casei* (ATCC 393)。

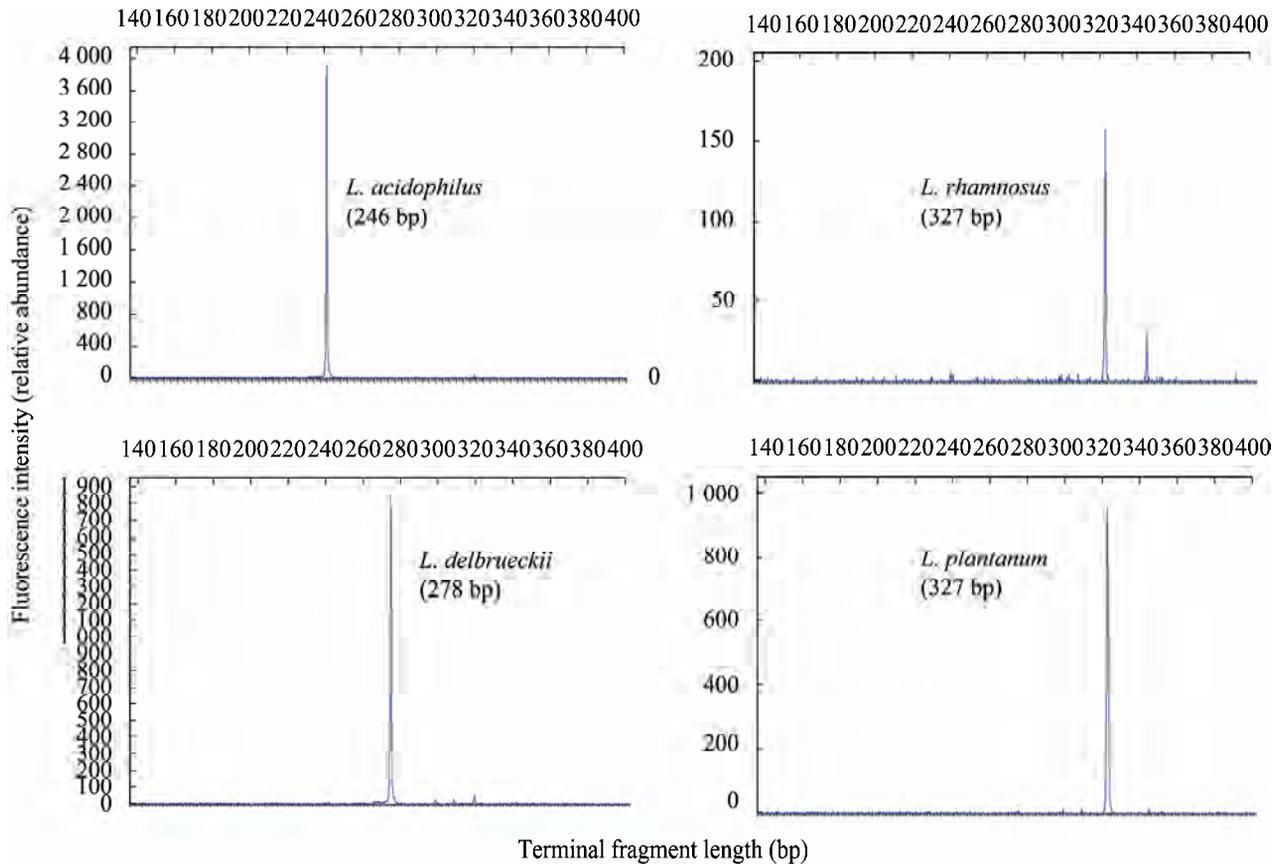
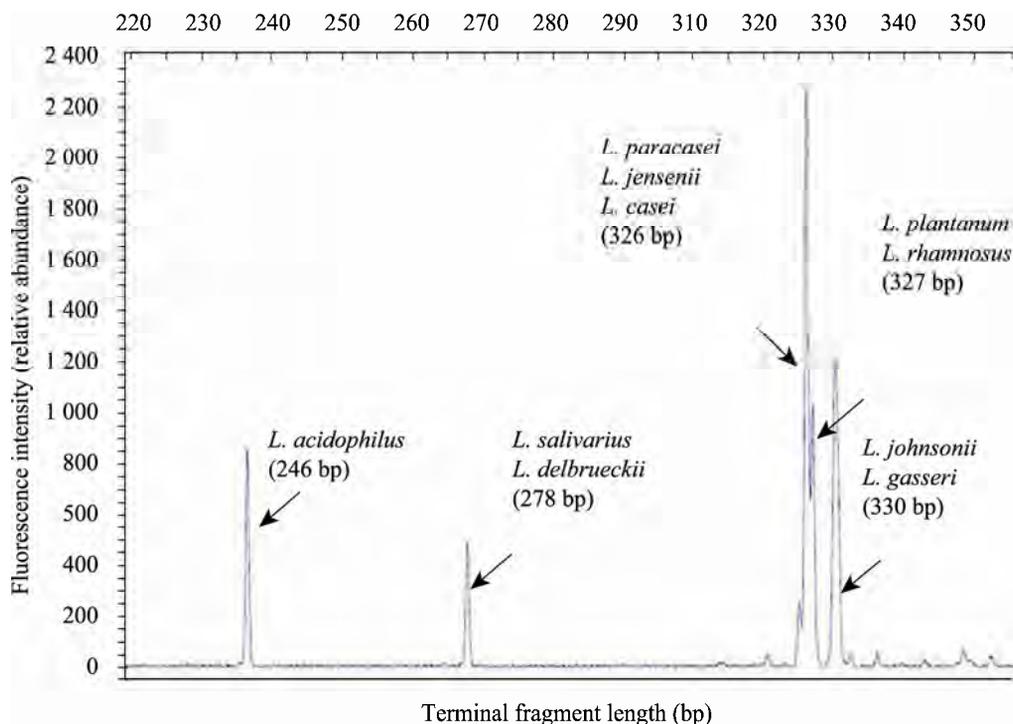
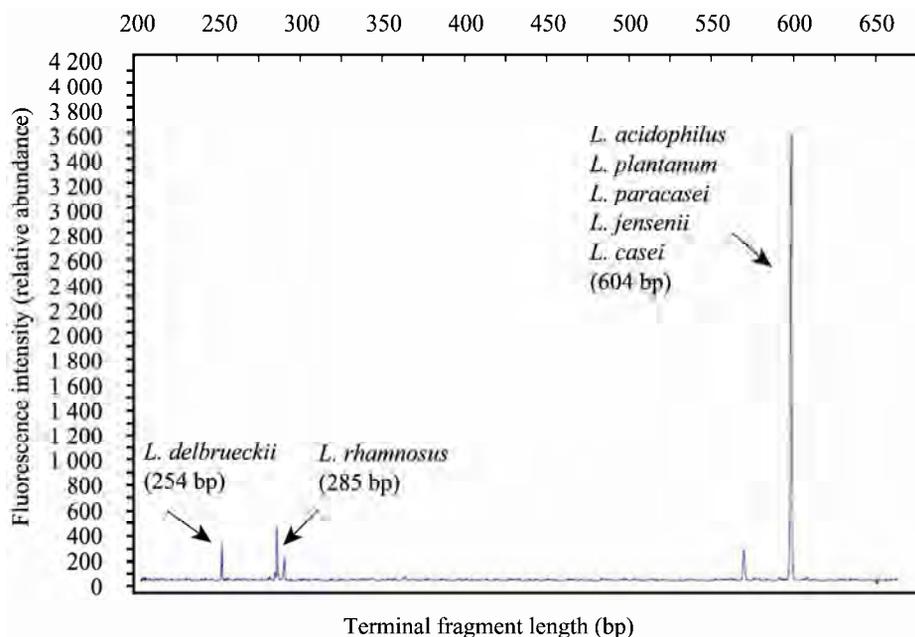


图5 限制性内切酶 *Hae* III 消化 4 种乳酸杆菌的 T-RFLP 图谱
 Fig. 5 T-RFLP profiles of 4 *Lactobacilli* digested by *Hae* III

同时, 我们也将这 14 株乳酸杆菌的混合菌液做了 PCR 扩增和限制性酶切分析, 同样进行 T-RFLP 检测, 得到混合样品的峰图。由表 2 可以看出, 理论上 *Hae* III 和 *Hha* I 分别消化 14 株混合乳酸杆菌都应该得到 5 个不同位置的峰。图 6 是限制性内切酶 *Hae* III 消化 14 株混合乳酸杆菌的 T-RFLP 图谱, 一共有 5 个不同位置的峰。图 7 是限制性内切酶 *Hha* I 消化 14 株混合乳酸杆菌的 T-RFLP 图谱, 一共有 3 个不同位置的峰, 其中加氏乳杆菌和约氏乳杆菌被 *Hha* I 消化后的末端片段长度均是 1 131 bp, 唾液乳杆菌被 *Hha* I 消化后的末端片段长度为 1 120 bp, 而 T-RFLP 检测的区域范围是 30–700 bp 左右, 所以加氏乳杆菌、约氏乳杆菌和唾液乳杆菌在图 7 上未被检测到。从两张图可以看出嗜酸乳杆菌、德氏乳杆菌拥有

自己特殊的末端片段长度, 所以运用 T-RFLP 技术能够快速、高效地判断微生态环境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 技术对微生物环境中绝大多数乳酸杆菌进行特异性检测。此外, 从图 6 (*Hae* III) 来看, 植物乳杆菌和鼠李糖乳杆菌拥有相等长度的 5'-末端限制片段, 但从图 7 (*Hha* I) 可以看出植物乳杆菌和鼠李糖乳杆菌的峰处于不同位置, 所以 *Hae* III 和 *Hha* I 的结合使用能更有效地区分乳酸杆菌属。然而像副干酪乳杆菌和詹氏乳杆菌在被这两种酶消化后拥有相同的末端片段长度, 在两个峰图上都不能被区分开, 针对此点, 可以选择第 3 种酶切末端片段不同的内切酶加入实验, 实现对乳酸杆菌属更有效的区分和判断。

图 6 限制性内切酶 *Hae* III 消化 14 株混合乳酸杆菌的 T-RFLP 图谱Fig. 6 T-RFLP analysis of the mixture of 14 *Lactobacillus* strains gene (digested by *Hae* III)图 7 限制性内切酶 *Hha* I 消化 14 株混合乳酸杆菌的 T-RFLP 图谱Fig. 7 T-RFLP analysis of the mixture of 14 *Lactobacillus* strains gene (digested by *Hha* I)

3 讨论

我们研究发现, LAB-rev 作为乳酸杆菌的属特异性引物, 与 16S 通用引物 7f 配对能特异地 PCR 扩增嗜酸乳杆菌、鼠李糖乳杆菌等所有本实验室保存的乳酸杆菌菌株, 但不能扩增双歧杆菌、大肠杆菌等其它多种非乳酸杆菌的菌种, 说明 7f/LAB-rev 对乳酸杆菌特异性强, 并适用于乳酸杆菌的 T-RFLP 种群检测。荧光物质 FAM、VIC、PET 和 NED 在与引物标记时不会影响 PCR 反应的特异性及灵敏度, 其中 FAM 能减少引物二聚体的形成, 不会影响后续的酶切和 T-RFLP 检测。同时, 限制性内切酶 *Hae* III 和 *Hha* I 的组合能有效地区分不同种的乳酸杆菌, 所以它们的联合使用让乳酸杆菌的 T-RFLP 检测技术得到了最好的优化, 并成功搭建了乳酸杆菌的 T-RFLP 分子生态学技术检测平台。

综上所述, T-RFLP 技术能够直接高效地对微生态制剂或肠道微生态中乳酸杆菌的种类进行快速检测, 并且能直观地反映出这些乳酸杆菌数量上的变化。因为乳酸杆菌是肠道主要益生菌之一, 它可以分解糖产酸, 抑制肠道致病菌及腐败菌的繁殖, 所以运用 T-RFLP 技术对乳酸杆菌的快速实时定量检测在食品安全方面具有重要的实用意义。我们可以运用此项 T-RFLP 技术搭建分子生态学技术平台用于胃肠道微生物的研究, 用于菌种鉴定、土壤和水环境生态群落对比分析、功能性食品、乳酸饮料和药物对肠道微生态的影响等领域。

参 考 文 献

- [1] 刘墨, 王长文, 周海柱, 等. 乳酸杆菌的研究进展[J]. 吉林医药学院学报, 2010, 31(4): 236-238.
- [2] 余素林, 吴晓磊, 钱易. 环境微生物群落分析的 T-RFLP 技术及其优化措施[J]. 应用与环境生物

学报, 2006, 12(6): 861-868.

- [3] Nogva HK, Rudi K, Naterstad K, et al. Application of 5'-nuclease PCR for quantitative detection of *listeria monocytogenes* in pure cultures, water, skim milk, and unpasteurized whole milk[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2000, 66(10): 4266-4271.
- [4] Voytek MA, Ward BB. Detection of ammonium-oxidizing bacteria of the beta-subclass of the class Proteobacteria in aquatic samples with the PCR[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1995, 61(4): 1444-1450.
- [5] Llobet-Brossa E, Rossell-Mora R, Amann R. Microbial community composition of Wadden Sea sediments as revealed by fluorescence in situ hybridization[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1998, 64(7): 2691-2696.
- [6] Macdonald R, Brözel VS. Community analysis of bacterial biofilms in a simulated recirculating cooling-water system by fluorescent *in situ* hybridization with rRNA-targeted oligonucleotide probes[J]. Water Research, 2000, 34(9): 2439-2446.
- [7] Wu XL, Conrad R. Functional and structural response of a cellulose-degrading methanogenic microbial community to multiple aeration stress at two different temperatures[J]. Environmental Microbiology, 2001, 3(6): 355-362.
- [8] Wu XL, Chin KJ, Stubner S, et al. Functional patterns and temperature response of cellulose-fermenting microbial cultures containing different methanogenic communities[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2001, 56(1/2): 212-219.
- [9] Acinas SG, Rodríguez-Valera F, Pedrós-Alió C. Spatial and temporal variation in marine bacterioplankton diversity as shown by RFLP fingerprinting of PCR amplified 16S rDNA[J]. FEMS Microbiology Ecology, 1997, 24(1): 27-40.
- [10] Rölleke S, Gurtner C, Drewello U, et al. Analysis of bacterial communities on historical glass by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified gene fragments coding for 16S rRNA[J]. Journal of Microbiological Methods,

- 1999, 36(1/2): 107-114.
- [11] 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.
- [12] Braker G, Ayala-del-Río 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.
- [13] 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.
- [14] 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.
- [15] 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.
- [16] 王洪媛, 管华诗, 江晓路. 微生物生态学中分子生物学方法及 T-RFLP 技术研究[J]. 中国生物工程杂志, 2004, 24(8): 42-47.
- [17] Dubernet S, Desmasures N, Guéguen M. A PCR-based method for identification of lactobacilli at the genus level[J]. FEMS Microbiology Letters, 2002, 214(2): 271-275.
- [18] Marsh TL, Liu WT, Forney LJ, et al. Beginning a molecular analysis of the eukaryal community in activated sludge[J]. Water Science and Technology, 1998, 37(4/5): 455-460.
- [19] Moeseneder MM, Arrieta JM, Muyzer G, et al. Optimization of terminal-restriction fragment length polymorphism analysis for complex marine bacterioplankton communities and comparison with denaturing gradient gel electrophoresis[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1999, 65(8): 3518-3525.

稿件书写规范

论文中统计学符号书写规则

统计学符号一般用斜体。本刊常用统计学符号介绍如下, 希望作者参照执行。

样本的算术平均数用英文小写 x , 不用大写 X , 也不用 $Mean$ 。标准差用英文小写 s , 不用 SD 。标准误用英文小写 $s_{\bar{x}}$, 不用 SE 。 t 检验用英文小写 t 。 F 检验用英文大写 F 。卡方检验用希文小写 χ^2 。相关系数用英文小写 r 。样本数用英文小写 n 。概率用英文大写 P 。