

研究报告

干酪乳杆菌的近缘种及亚种部分看家基因的系统发育分析

多拉娜 宋宇琴 李伟程 李晶 徐海燕 孙志宏 张和平*

(内蒙古农业大学 乳品生物技术与工程教育部重点实验室 农业部奶制品加工重点实验室

内蒙古 呼和浩特 010018)

摘要:【背景】16S rRNA 基因序列分析已广泛应用于细菌的分类鉴定,但是存在一定局限性,而使用看家基因作为分子标记在近缘种及亚种间的系统发育分析中具有其独特的优势。【目的】研究 16S rRNA、*uvrC* (核酸外切酶 ABC, C 亚基)和 *murE* (UDP-N-乙酰胞壁酰三肽合酶)基因序列对干酪乳杆菌的近缘种及亚种的区分能力。【方法】采用分离自传统发酵乳中的 6 株干酪乳杆菌为研究对象,选取 *uvrC* 和 *murE* 基因片段,通过 PCR 扩增、测序,结合已公布的干酪乳杆菌的近缘种或亚种的相应序列计算遗传距离、构建系统发育树,并与 16S rRNA 基因序列分析技术进行比较。【结果】研究发现 *Lactobacillus casei* 及相近种间的 *uvrC*、*murE* 和联合基因 (*uvrC-murE*)构建的系统发育树拓扑结构与 16S rRNA 基因结果基本一致,区别在于相似性的不同,其分别为 79.00%–99.16%、89.08%–99.20%、76.56%–99.69%和 99.58%–100%。基于 16S rRNA 基因不能区分干酪乳杆菌的近缘种及亚种,而看家基因 *uvrC* 和 *murE* 基因序列能够很好地区分干酪乳杆菌的近缘种及亚种,并且将 *uvrC* 和 *murE* 基因串联使用后,试验菌株与参考菌株的分类关系更加清晰。【结论】联合基因(*uvrC-murE*)可作为 16S rRNA 基因的辅助工具用于干酪乳杆菌的近缘种及亚种的快速准确鉴定。

关键词: 干酪乳杆菌, 系统发育分析, 16S rRNA 基因, *uvrC*, *murE*

Phylogenetic analysis of *Lactobacillus casei* and closely related species/subspecies based on sequences of housekeeping genes

Duolana SONG Yu-Qin LI Wei-Cheng LI Jing XU Hai-Yan

SUN Zhi-Hong ZHANG He-Ping*

(Inner Mongolia Agricultural University, Key Laboratory of Dairy Biotechnology and Engineering, Ministry of Education, Key Laboratory of Dairy Products Processing, Ministry of Agriculture, Hohhot, Inner Mongolia 010018, China)

Abstract: [Background] 16S rRNA gene sequence is widely used in the classification and identification of bacteria, although still with some limitations. The housekeeping gene as a molecular marker has its unique advantages in phylogenetic analysis among related species and subspecies. [Objective] We used 16S rRNA, *uvrC* (excinuclease ABC subunit C) and *murE* (UDP-N-acetylmuramyl

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (31430066, 31622043)

*Corresponding author: E-mail: hepingdd@vip.sina.com

Received: February 02, 2018; **Accepted:** April 13, 2018; **Published online** (www.cnki.net): June 04, 2018

基金项目: 国家自然科学基金(31430066, 31622043)

*通信作者: E-mail: hepingdd@vip.sina.com

收稿日期: 2018-02-02; 接受日期: 2018-04-13; 网络首发日期(www.cnki.net): 2018-06-04

tripeptide synthase) gene sequences to identify the phylogenetic relationship among *Lactobacillus casei* and its related species/subspecies. **[Methods]** Six *L. casei* strains isolated from traditional dairy products were selected. The *uvrC* and *murE* gene sequences of each isolates were obtained by polymerase chain reaction (PCR) methods and sequencing technology. Then, we estimated the genetic distance and constructed phylogenetic trees of 6 *L. casei* strains combined with 5 published related species/subspecies based on the sequences of 16S rRNA gene, *uvrC* and *murE* gene, respectively. **[Results]** Phylogenetic trees indicated that the homology of closely related *L. casei* species among *uvrC*, *murE*, the combined genes (*uvrC-murE*) and 16S rRNA gene were different, ranged from 79.00% to 99.16%, 89.08% to 99.20%, 76.56% to 99.69% and 99.58% to 100%. *L. casei* and its related species and subspecies cannot be distinguished by 16S rRNA gene sequence analysis. The phylogenetic tree based on the sequences of combined gene (*uvrC-murE*) had a distinct classification on genetic relationship of *L. casei* and its related species and subspecies. **[Conclusion]** Phylogenetic analysis based on the combined gene (*uvrC-murE*) can be used as a supplementary of 16S rRNA gene analysis for rapid classification and identification of *L. casei* and its related species and subspecies.

Keywords: *Lactobacillus casei*, Phylogenetic analysis, 16S rRNA gene, *uvrC*, *murE*

干酪乳杆菌(*Lactobacillus casei*)是革兰氏阳性、兼性厌氧的乳杆菌属中的一个种,对营养条件和发酵条件要求严格^[1]。它通常存在于生乳或发酵乳制品、人和动物的肠道以及新鲜蔬菜或发酵蔬菜制品中^[2]。干酪乳杆菌是一种具有调节肠道菌群平衡、促进人体消化吸收以及增强免疫等多种功能的益生菌^[3-4]。本研究团队自主分离、筛选自内蒙古地区传统发酵酸马奶中的 *Lactobacillus casei* Zhang 是性能优异的益生菌^[5],它具有较强的耐人工胃液、胆盐消化、免疫调节、抗氧化等益生功效^[6-9]。

长期以来,干酪乳杆菌及其近缘种的分类学地位一直存在争议。干酪乳杆菌菌群经历了从早期的 *Lactobacillus casei* subsp. *casei*、*Lactobacillus casei* subsp. *alactosus*、*Lactobacillus casei* subsp. *pseudoplantarum*、*Lactobacillus casei* subsp. *tolerans* 和 *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus*, 到 *L. casei/paracasei*、*L. rhamnosus*、*L. zaeae*, 直到现在 *L. casei*、*L. paracasei*、*L. rhamnosus* 的划分^[10-14]。由此可以看出,干酪乳杆菌及其近缘物种间的亲缘关系错综复杂,种内分类学地位一直存在争议,基于传统的分类学方法只能勉强将其从种水平上区分开来,因此急需一种快速准确且分辨率较高的分类鉴定方法。随着分子生物学技术的迅速发展,产生了许多新的分类鉴定方法,如随机

扩增 DNA 多态性^[15]、种特异性 PCR^[16]、核糖体分型^[17]、转录间隔区序列分析^[18],但是以上方法在分类鉴定中存在一定的局限性。16S rRNA 基因序列的比较分析是细菌分类和鉴定的常用分子方法。但 Mori 等^[19]研究发现干酪乳杆菌及其近缘种间的 16S rRNA 基因序列相似性超过 99%,因此使用该方法无法对干酪乳杆菌及其近缘种种内进行分类鉴定。刘光全等^[20]尝试采用不同看家基因分析干酪乳杆菌群的系统进化关系,同时证明看家基因 *pheS* 比 16S rRNA 基因具有更高的分辨率。这提示我们,看家基因能够区分鉴定干酪乳杆菌及其近缘种间的系统发育关系。

本研究分析了 12 株干酪乳杆菌的 16S rRNA、看家基因 *uvrC* (核酸外切酶 ABC, C 亚基)和 *murE* (UDP-N-乙酰胞壁酰三肽合酶)基因序列,与 GenBank 数据库中下载模式菌株的 16S rRNA、*uvrC* 和 *murE* 以及 *uvrC-murE* 串联基因序列比对分析,对 12 株干酪乳杆菌的系统发育关系进行全面地阐述。本研究为我国优良益生菌株的筛选及快速鉴定奠定坚实的理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验菌株

研究所用 6 株干酪乳杆菌均由内蒙古农业大学

乳品生物技术与工程教育部重点实验室提供, 详细信息见表 1。Bao 等^[2]运用 10 种看家基因(*carB*、*clpX*、*dnaA*、*groEL*、*murE*、*pyrG*、*pheS*、*recA*、*rpoC*、*uvrC*)对 224 株干酪乳杆菌进行多位点序列分型研究(MLST), 本研究从中随机选取

6 株干酪乳杆菌(为了方便描述, 下称已发表菌株), 共构建 12 株菌的菌株集, 以验证本研究中分型方法的普适性。菌株的具体信息见表 2。另外, 本研究还选取 5 株干酪乳杆菌及其近缘种的模式菌株作为参考菌株, 具体信息见表 3。

表 1 试验菌株的 16S rRNA、*uvrC* 和 *murE* 基因登录号

Table 1 Strains and accession numbers of 16S rRNA, *uvrC* and *murE* genes

菌株 Strains	分离基物采样地 Sampling location	分离源 Source	GenBank 登录号 GenBank accession numbers		
			16S rRNA gene	<i>uvrC</i>	<i>murE</i>
IMAU10787	中国内蒙古赤峰巴林右旗巴彥温度尔苏木 Bayanunder soum balinyouqi chifeng city, Inner mongolia autonomous region, China	酸牛奶 Yogurt	HM218507.1	MG772826	MG772820
IMAU10847	中国内蒙古赤峰巴林右旗大板镇西拉木伦嘎查 Xilamulun soum daban town balinyouqi chifeng city, Yogurt Inner mongolia autonomous region, China	酸牛奶	HM218558.1	MG772827	MG772821
IMAU20578	蒙古扎布汗省奥特跟苏木 Otgon soum, Zavhan province, Mongolia	酸牛奶 Yogurt	HM058296.1	MG772828	MG772822
IMAU70074	中国内蒙古呼和浩特市托克托县双河镇 Shuanghe town tuoketuo country hohhot city, Inner mongolia autonomous region, China	酸粥 Acidic gruel	GQ131190.1	MG772829	MG772823
IMAU80303	中国四川省阿坝州红原县瓦切乡二队 Waqie district hongyuan country tibetan qiang Qula autonomous prefecture of ngawa, Sichuan province, China	曲拉	HM058583.1	MG772830	MG772824
IMAU80732	中国甘肃省甘南藏族自治州碌曲县麻艾乡 Qumaai district luqu country gannan tibetan autonomous Yak milk prefecture, Gansu province, China	鲜牦牛奶	HM058907.1	MG772831	MG772825

表 2 6 株下载自 NCBI 菌株的 16S rRNA、*uvrC* 和 *murE* 基因登录号

Table 2 Six strains downloaded from NCBI and accession numbers of 16S rRNA, *uvrC* and *murE* genes

菌株 Strains	分离基物采样地 Sampling location	分离源 Source	GenBank 登录号 GenBank accession numbers		
			16S rRNA gene	<i>uvrC</i>	<i>murE</i>
IMAU10532 ^[2]	中国内蒙古呼伦贝尔盟新巴尔虎左旗查干镇 Chgan town xin barag left banner hulun buir city, Inner Koumiss mongolia autonomous region, China	酸马奶	HM218257.1	KT802484.1	KT801364.1
IMAU10541 ^[2]	中国内蒙古呼伦贝尔盟新巴尔虎左旗查干镇 Chgan town xin barag left banner hulun buir city, Inner Koumiss mongolia autonomous region, China	酸马奶	HM218266.1	KT802486.1	KT801366.1
IMAU80452 ^[2]	中国四川省阿坝州红原县安曲乡三村 Anqu district hongyuan country tibetan qiang autonomous Qula prefecture of ngawa, Sichuan province, China	曲拉	HM058704.1	KT802631.1	KT801511.1
IMAU80853 ^[2]	中国甘肃省甘南藏族自治州玛曲县阿尼玛乡 Anima district maqu country gannan tibetan autonomous Kurut prefecture, Gansu province, China	酸牦牛奶	HM059013.1	KT802659.1	KT801539.1
IMAU70046 ^[2]	中国内蒙古包头市固阳县 Guyang town baotou city, Inner mongolia autonomous Acidic gruel region, China	酸粥	GQ131162.1	KT802589.1	KT801469.1
IMAU80810 ^[2]	中国甘肃省甘南藏族自治州碌曲县晒银滩 Qumaai district luqu country gannan tibetan autonomous Qula prefecture, Gansu province, China	曲拉	HM058975.1	KT802656.1	KT801536.1

表 3 参考菌株及基因序列 GenBank 登录号

Table 3 GenBank accession numbers of the reference strains

菌株 Strains	16S rRNA gene	<i>uvrC</i>	<i>murE</i>
<i>L. paracasei</i> subsp. <i>tolerans</i> DSM20258 ^T	AB181950	AYYJ000000000.1	AYYJ000000000.1
<i>L. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> DSM5622 ^T	D79212	NZ_AZGH01000170.1	NZ_AZGH01000170.1
<i>L. casei</i> DSM20011 ^T	AF469172	NZ_AZCO01000139.1	NZ_AZCO01000139.1
<i>L. zae</i> DSM20178 ^T	D86516	NZ_AZCT01000055.1	NZ_AZCT01000055.1
<i>L. rhamnosus</i> DSM20021 ^T	D16552	NZ_AZCQ01000038.1	NZ_AZCQ01000038.1

注：^T：模式菌株。

Note: ^T: Model strain.

1.1.2 主要试剂和仪器

MRS 培养基，广东环凯有限公司；PCR 试剂，大连 TaKaRa 公司；Applied biosystems PCR 仪，伯乐公司；微量紫外分光光度计，NanoDrop 公司；全自动高压蒸汽灭菌器，Hirayama 公司；恒温水浴锅，上海一恒科技有限公司；凝胶成像分析系统，UVP 公司；电热恒温培养箱，北京一恒科技有限公司；电子天平，上海精天电子仪器有限公司；高速冷冻离心机，Eppendorf 公司；电泳仪，北京六一生物科技有限公司。

1.1.3 试验所用引物

通过比较基因组学分析，选择 *uvrC* 和 *murE* 两个单拷贝且含有多变区的基因为目标序列。结合序列比对信息，采用 Primer 5.0 设计通用引物(表 4)，引物由上海美吉生物医药科技有限公司合成。

1.2 DNA 提取、PCR 扩增和测序

采用 CTAB-液氮冻融法提取菌株基因组 DNA^[21]。将提取的基因组 DNA 稀释至 100 ng/μL 左右作为 PCR 扩增模板。PCR 反应体系(50 μL)：

表 4 PCR 扩增引物

Table 4 PCR primers used in this study

基因 Genes	引物 Primers	序列 Sequences (5'→3')	长度 Size (bp)
<i>uvrC</i>	p-F	CAGTTAGAACGCCACAGC	18
	p-R	CTGCCGATGGAAGGTAAT	18
<i>murE</i>	p-F	ATGATTACGCAAGGTCTC	19
	p-R	AGCACTGGCAAACAGGTA G	19

DNA 模板(100 ng/μL) 1 μL，10×*Easy Taq* buffer (Mg²⁺) 5 μL，High Pure dNTPs (2.5 mmol/L) 4 μL，正、反向引物(10 mmol/L)各 1.5 μL，DNA 聚合酶 (5 U/μL) 0.5 μL，去离子水补充至 50 μL^[22]。*uvrC* 基因的 PCR 反应条件：95 °C 5 min；95 °C 1 min，60 °C 45 s，72 °C 1 min，30 个循环；72 °C 10 min。*murE* 基因的 PCR 反应条件除了退火温度为 52 °C，其余反应条件均与 *uvrC* 基因一致。PCR 产物用 1.2%琼脂糖凝胶电泳检测，并将扩增成功的产物送上海美吉生物医药科技有限公司测序。

1.3 序列分析与系统发育树的构建

6 株试验菌株的 *uvrC* 和 *murE* 基因扩增产物经纯化、测序获得其相对应的核苷酸序列，上传至 NCBI，已获得登录号(表 1)。所有菌株的 16S rRNA 基因序列均下载自 GenBank 数据库(序列登录号见表 1、表 2 和表 3)，6 株已发表菌株及 5 株参考菌株的 *uvrC* 和 *murE* 基因序列从 GenBank 数据库中下载(序列登录号见表 2、表 3)。采用 MEGA 6.0 软件进行 ClustalW 比对，运用邻接法(Neighbour-Joining, N-J)分别构建基于 16S rRNA、*uvrC* 和 *murE* 基因序列以及 *uvrC*-*murE* 串联序列的系统发育树，数据自展重复抽样次数 1 000 次。

2 结果与分析

2.1 基于 16S rRNA 基因的系统发育分析

根据 12 株试验菌株和 5 株参考菌株的 16S rRNA 基因序列，采用 N-J 法构建系统发育树，计算其进化距离，结果如图 1 所示。结果显示，

17 株菌共划分为两大类(I、II), I 类群分为 2 个亚群(A、B)。I 类群的 A 亚群中 12 株菌株与 *L. paracasei* subsp. *tolerans* DSM20258^T、*L. paracasei* subsp. *paracasei* DSM5622^T 聚为一类, 它们两两之间的 16S rRNA 基因序列平均相似性均为 99.99%。其中, 模式菌株 *L. paracasei* subsp. *tolerans* DSM20258^T 和 *L. paracasei* subsp. *paracasei* DSM5622^T 以 100% 的相似性聚为一类。A 亚群菌株与 B 亚群中的菌株 *L. casei* DSM20011^T、*L. zeae* DSM20178^T 两两之间的平均相似性为 99.70%。I 类群与 II 类群的平均差异性较小, 仅为 0.46%。

刘光全等^[20]研究发现干酪乳杆菌与其近缘种

的一致性都在 99% 以上, 二者不能通过 16S rRNA 基因被有效区分开。本研究得到相同的结果, 16S rRNA 基因序列很难区分干酪乳杆菌的近缘种及亚种, 需要选用一种比 16S rRNA 基因分辨率高的方法对其进行分类鉴定。

2.2 基于 *uvrC* 基因部分序列的系统发育分析

基于 *uvrC* 基因部分序列构建的系统发育树中, 12 株试验菌株与 5 株参考菌株构建的系统发育树仍形成较为稳定的两大类(I、II), I 类群分成 3 个亚群(A、B、C), 但相似性与 16S rRNA 基因不同。如图 2 所示, I 类群中 12 株菌株和 3 株参考菌株聚为一类。A 亚群即菌株 IMAU10787、IMAU70074、IMAU10541、IMAU70046 与参考菌

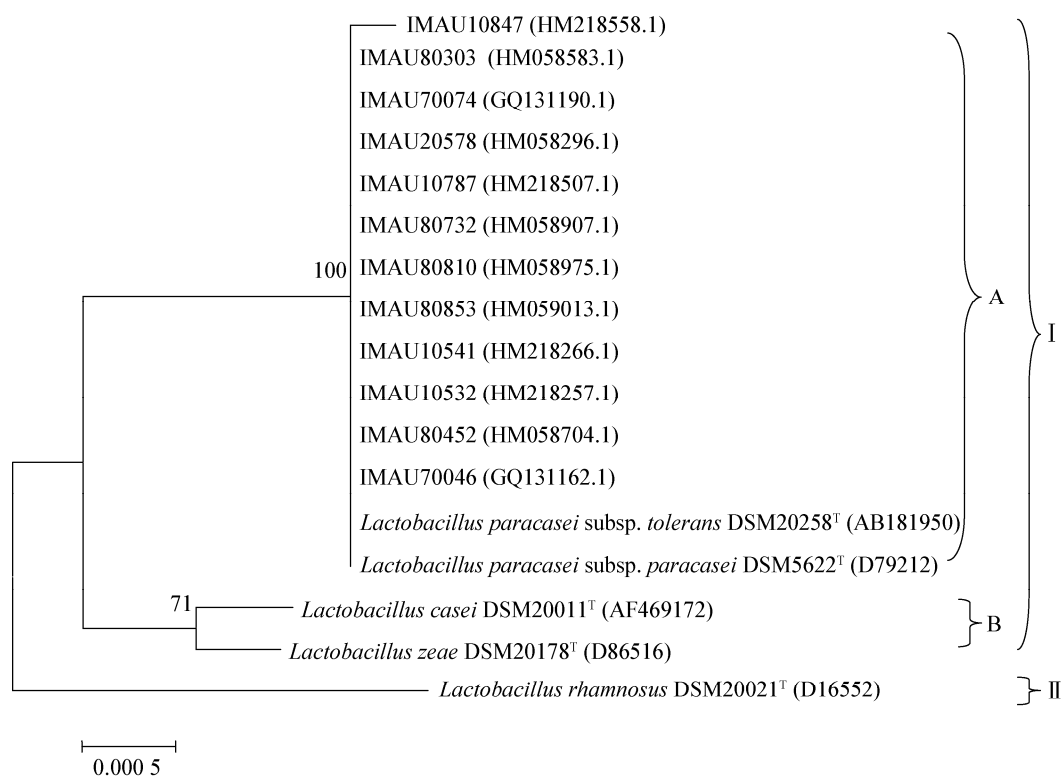


图 1 12 株试验菌株与参考菌株的 16S rRNA 基因系统发育树

Figure 1 Phylogenetic tree contrasted by 16S rRNA gene sequences of 12 strains and references

注: 分支点上的数字为 Bootstrap 值, 代表分类单位被聚在一起的几率; 比例尺显示水平线的长度, 代表碱基替换数; 括号里的序列为菌株的基因登录号。

Notes: The numbers of nodes indicate bootstrap values, and represent the percentages of 1 000 bootstrap replications in which the taxa to the right are placed together; The scale bar represents the horizontal branch lengths and the number of substitutions per nucleotide position; The sequence in parentheses is the strain accession number.

株 *L. casei* DSM20011^T 为一个分支, 菌株 IMAU80810、IMAU80732、IMAU80853 与参考菌株 *L. paracasei* subsp. *paracasei* DSM5622^T 聚为一小分支, 菌株 IMAU10532、IMAU80452、IMAU10847、IMAU20578 和参考菌株 *L. paracasei* subsp. *tolerans* DSM20258^T 聚为 C 类, 它们基因序列两两之间的相似性大于 97.38%。IMAU80303 未与参考菌株划分为一类, 它与模式菌株 *L. paracasei* subsp. *tolerans* DSM20258^T、*L. casei* DSM20011^T、*L. paracasei* subsp. *paracasei* DSM5622^T 的相似性分别为 98.46%、99.12%、

98.68%。A 亚群与 B 亚群两两菌株之间的基因平均相似性为 81.63%, 与 C 亚群之间基因平均相似性为 79.00%。II 类群中 *L. rhamnosus* DSM20021^T 和 *L. zeae* DSM20178^T 的基因差异性为 19.16%, 比 16S rRNA 基因序列有更大的差异性。结果显示, 相较于 16S rRNA 基因序列, *uvrC* 基因序列在干酪乳杆菌的近缘种及亚种的分类中有较高的分辨率。

2.3 基于 *murE* 基因部分序列的系统发育分析

基于 *murE* 基因部分序列构建的系统发育树如图 3 所示, 12 株菌与 5 株参考菌构建的系统发育树仍形成较为稳定的两个大类(I、II)。I 类群中 12 株

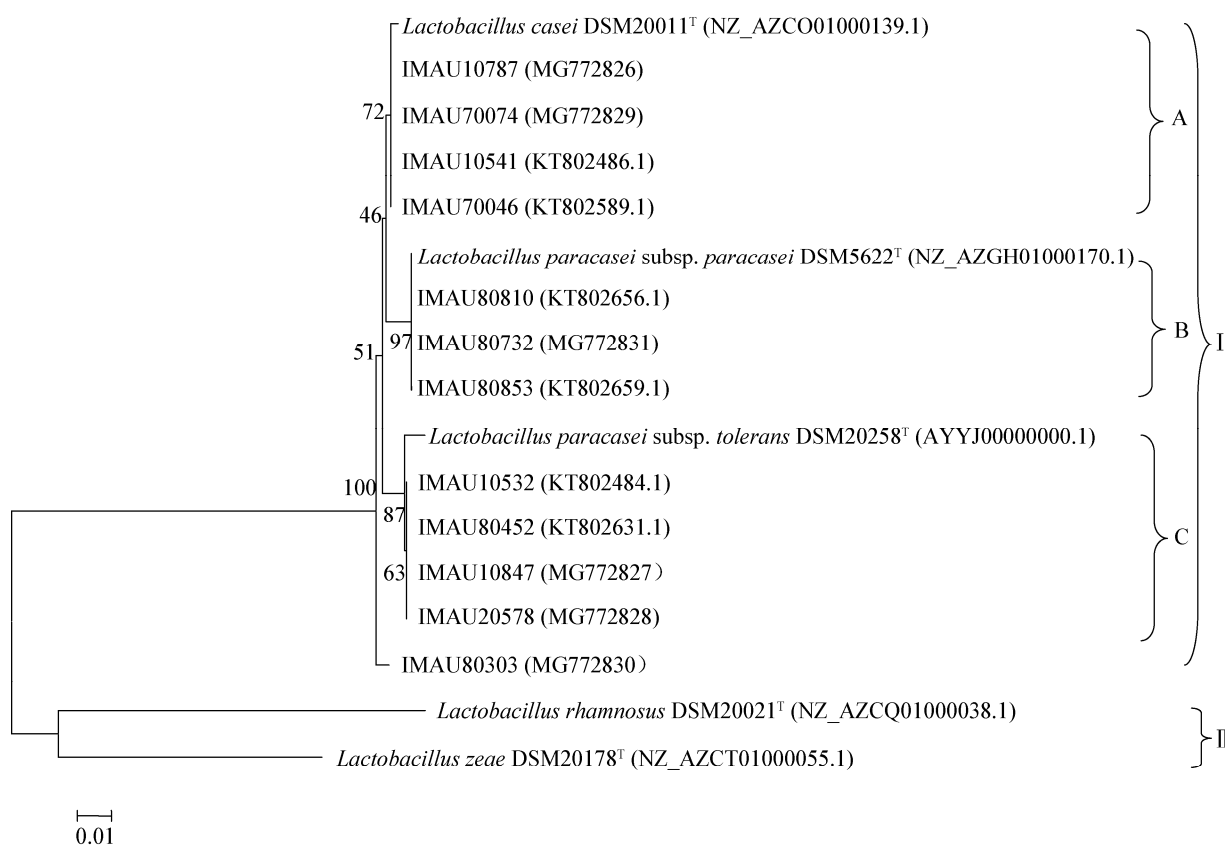


图 2 12 株试验菌株与参考菌株的 *uvrC* 基因系统发育树

Figure 2 Phylogenetic tree contrasted by *uvrC* gene sequences of 12 strains and references

注: 分支点上的数字为 Bootstrap 值, 代表分类单位被聚在一起的几率; 比例尺显示水平线的长度, 代表碱基替换数; 括号里的序列为菌株的基因登录号。

Notes: The numbers of nodes indicate bootstrap values, and represent the percentages of 1 000 bootstrap replications in which the taxa to the right are placed together; The scale bar represents the horizontal branch lengths and the number of substitutions per nucleotide position; The sequence in parentheses is the strain accession number.

菌和 3 株参考菌聚为一类, I 类群又分为 3 个小的分支(A、B、C)。菌株 IMAU80303、IMAU10847 和参考菌株 *L. paracasei* subsp. *paracasei* DSM5622^T 聚为一小分支, 菌株 IMAU10532、IMAU80853、IMAU80452、IMAU80810、IMAU20578、IMAU80732 与参考菌株 *L. paracasei* subsp. *tolerans* DSM20258^T 聚为 B 类, 菌株 IMAU10541、IMAU70046、IMAU10787、IMAU70074 与参考菌株 *L. casei* DSM20011^T 聚为另一分支。它们基因序列两两之间的相似性大于 98.81%。A 亚群与 B 亚群两两菌株之间的基因平均相似性为 92.47%, 与

C 亚群之间基因平均相似性为 89.08%。模式菌株 *L. paracasei* subsp. *tolerans* DSM20258^T 和 *L. paracasei* subsp. *paracasei* DSM5622^T 的平均差异达到 0.2%, 比 16S rRNA 基因序列有更大的差异性。结果表明, *murE* 基因区分干酪乳杆菌的近缘种及亚种的分辨率高于 16S rRNA 基因, 因此利用 *murE* 基因能很好地区分干酪乳杆菌的近缘种及亚种。

2.4 基于 *uvrC-murE* 联合基因序列的系统发育分析

基于 *uvrC-murE* 联合基因序列构建的系统发育树如图 4 所示。图 4 中 I 类群中 12 株菌和 3 株参考菌

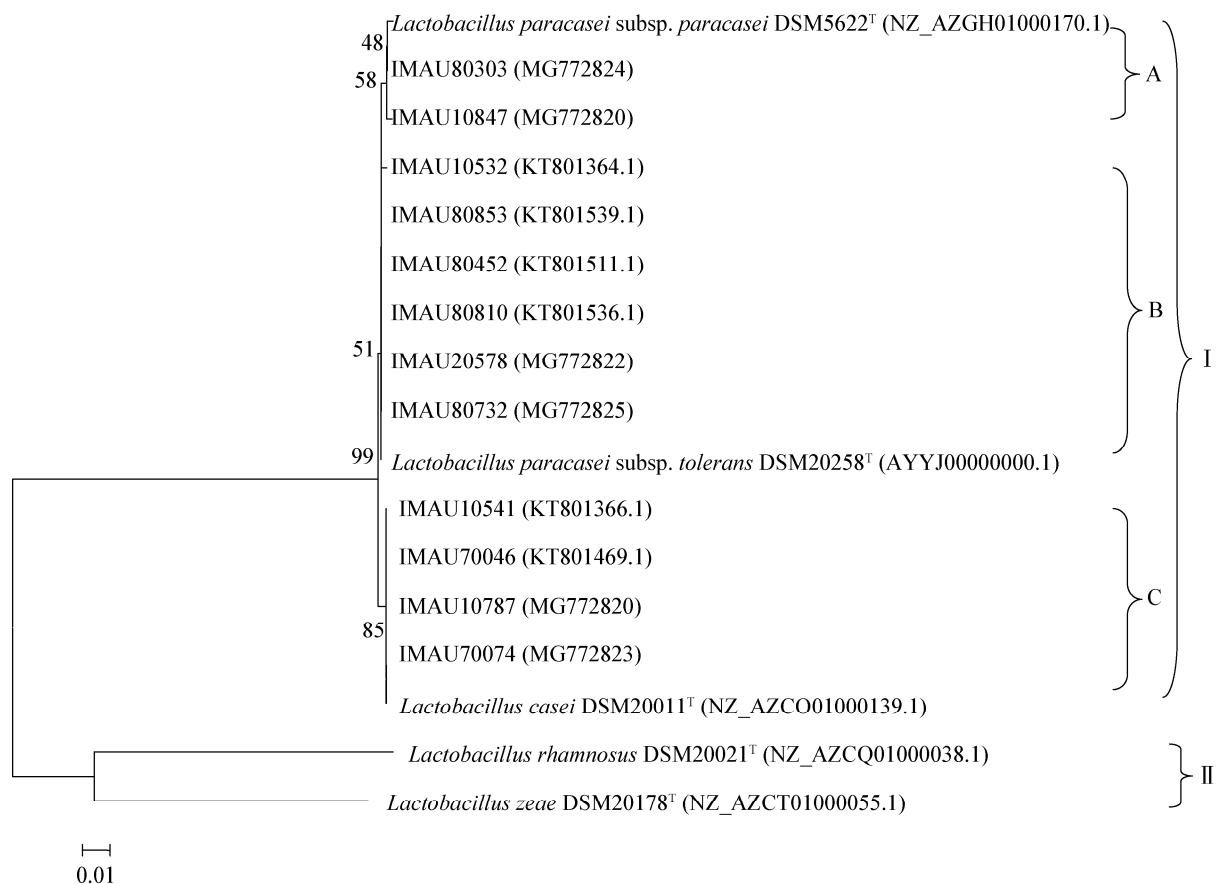


图 3 12 株试验菌株与参考菌株的 *murE* 基因系统发育树

Figure 3 Phylogenetic tree contrasted by *murE* gene sequences of 12 strains and references

注: 分支点上的数字为 Bootstrap 值, 代表分类单位被聚在一起的几率; 比例尺显示水平线的长度, 代表碱基替换数; 括号里的序列为菌株的基因登录号。

Notes: The numbers of nodes indicate bootstrap values, and represent the percentages of 1 000 bootstrap replications in which the taxa to the right are placed together; The scale bar represents the horizontal branch lengths and the number of substitutions per nucleotide position; The sequence in parentheses is the strain accession number.

聚为一类, I 类群又分为 3 个小的分支(A、B、C)。菌株 IMAU10532、IMAU20578、IMAU80452、IMAU10847 和参考菌株 *L. paracasei* subsp. *tolerans* DSM20258^T 为一个分支, 菌株 IMAU80853、IMAU80810、IMAU80732 和参考菌株 *L. paracasei* subsp. *paracasei* DSM5622^T 聚为一小分支, 菌株 IMAU70074、IMAU10541、IMAU70046、IMAU10787 与参考菌株 *L. casei* DSM20011^T 聚为另一分支。它们基因序列两两之间的相似性大于 93.16%。IMAU80303 未与参考菌株划分为一小分支, 它与模式菌株 *L. paracasei* subsp. *tolerans* DSM20258^T、*L. casei* DSM20011^T、*L. paracasei* subsp. *paracasei* DSM5622^T 的相似性分别为

99.06%、99.17%、99.27%。A 亚群与 B 亚群两两菌株之间的基因平均相似性为 78.19%, 与 C 亚群之间基因平均相似性为 76.56%。模式菌株 *L. paracasei* subsp. *tolerans* DSM20258^T 和 *L. paracasei* subsp. *paracasei* DSM5622^T 的平均差异达到 1.04%, 比 *murE* 和 16S rRNA 基因序列有更大的差异性。II 类群中 *L. rhamnosus* DSM20021^T 与 *L. zeae* DSM20178^T 的基因差异性为 19.39%, 比 *uvrC* 和 16S rRNA 基因序列有更大的差异性。结果表明, *uvrC-murE* 联合基因区分干酪乳杆菌的近缘种及亚种的分辨率高于 *uvrC*、*murE* 和 16S rRNA 基因。因此, 相对于单一的 *uvrC* 和 *murE* 基因, *uvrC-murE* 联合基因发育树更能清晰分析干酪乳杆菌的近缘种及亚种间的关系。

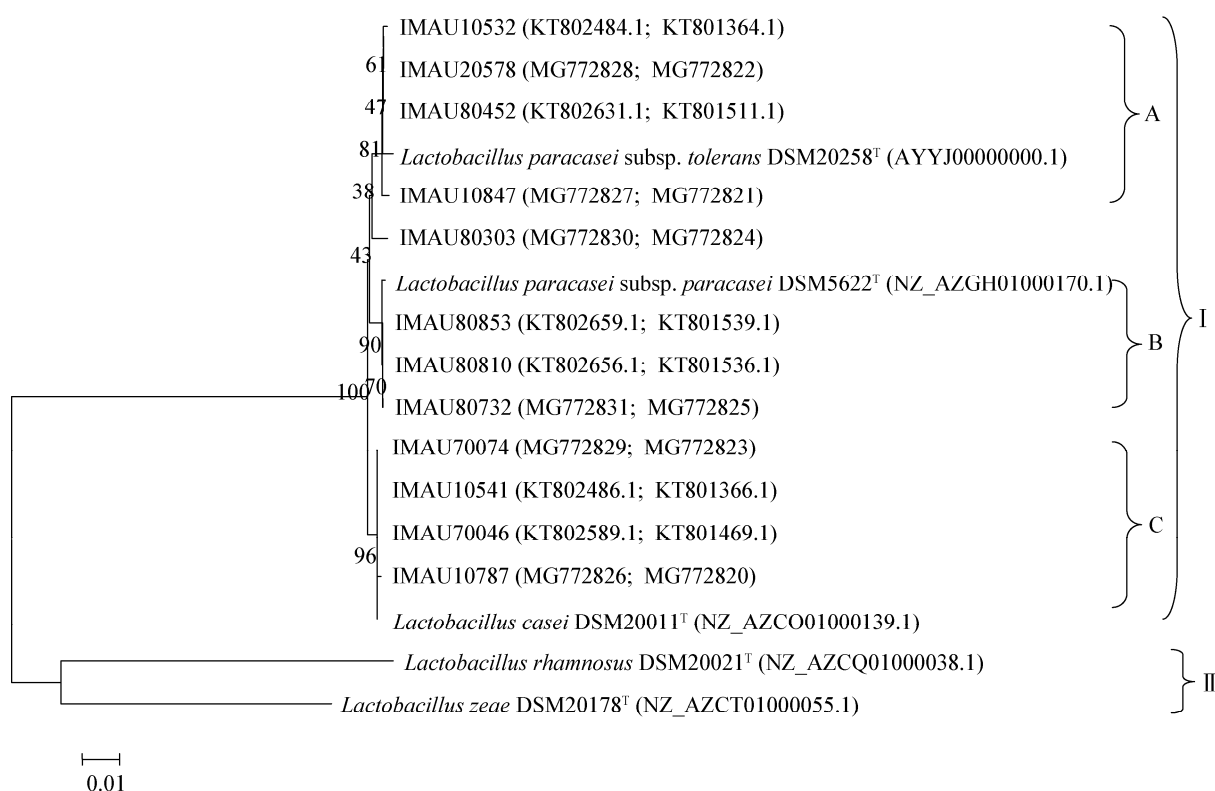


图 4 12 株试验菌株与参考菌株的 *uvrC-murE* 基因系统发育树

Figure 4 Phylogenetic tree contrasted by *uvrC-murE* gene sequences of 12 strains and references

注: 分支点上的数字为 Bootstrap 值, 代表分类单位被聚在一起的几率; 比例尺显示水平线的长度, 代表碱基替换数; 括号里的序列为菌株的基因登录号。

Notes: The numbers of nodes indicate bootstrap values, and represent the percentages of 1 000 bootstrap replications in which the taxa to the right are placed together; The scale bar represents the horizontal branch lengths and the number of substitutions per nucleotide position; The sequence in parentheses is the strain accession number.

3 讨论与结论

近年来, 16S rRNA 基因序列分析已普遍应用于细菌的系统发育及分类鉴定中。但由于 16S rRNA 基因序列多拷贝及高度保守性等特点, 将其应用在某些细菌的分类研究中存在一定缺陷, 尤其是在一些亲缘关系较近的种或亚种的分类鉴定中, 16S rRNA 基因序列分析只能给出一个不确定的结果。干酪乳杆菌及其近缘种之间的 16S rRNA 基因相似性较高, 仅用 16S rRNA 基因序列分析无法准确对其进行分类鉴定。而使用不同的看家基因作为分子标记在近缘细菌间的系统发育分析中显著优于 16S rRNA 基因, 已显示出独特的优势^[23], 逐渐发展成为一种新的技术。Felis 等^[24]通过对 *recA* 基因片段的测序和系统发育分析评估了干酪乳杆菌种的分类学位置, 成功将 *Lactobacillus casei* 区分开。冯淑贞等^[25]对比研究了 16S rRNA 基因以及 *dnaA*、*rpoB* 看家基因对于肠膜明串珠菌 (*Leuconostoc mesenteroides*) 及其近缘种的鉴定能力, 结果表明看家基因 *dnaA*、*rpoB* 更容易鉴定肠膜明串珠菌及其近缘种。Huang 等^[26]使用 *dnaK* 序列来区分植物乳杆菌种群, 克服了 16S rRNA 基因多态性低的问题。

有研究表明, 看家基因 *recA*、*tuf*、*pheS* 序列分析能够揭示干酪乳杆菌群内相近菌株的差异, 进一步证实看家基因序列分析能够对干酪乳杆菌菌群进行鉴定。赵思雨等^[27]研究发现 *recA* 基因可以将干酪乳杆菌菌群进行种水平的鉴定。此外, *recA* 基因将曾有争议的 ATCC 334 与 *L. paracasei* subsp. *paracasei* DSM5622 聚为同一分支, 而 ATCC 334 与 *L. casei* DSM20011 聚在 2 个完全不同的系统发育分支中, 而未能有效区分开 *L. paracasei* subsp. *tolerans* 和 *L. paracasei* subsp. *paracasei* 2 个亚种。本研究采用看家基因 *uvrC* 和 *murE* 所构建的系统发育树中, *L. paracasei* subsp. *paracasei* DSM5622 与 *L. casei* DSM20011 也处于不同的分支。研究表明, 干酪乳杆菌菌群的看家基

因 *tuf* 平均相似性为 94.0%^[28]。本研究采用的看家基因 *uvrC* 和 *murE* 对 12 株干酪乳杆菌分离株以及 5 株参考菌株在亚种水平上进行分类鉴定。研究发现, 看家基因 *uvrC* 和 *murE* 基因的平均相似性分别为 79.0% 和 89.08%, 较 *tuf* 基因序列有更小的相似性。刘光全等^[20]对比研究了 16S rRNA 基因以及看家基因 *pheS* 对干酪乳杆菌的鉴定能力, 结果表明看家基因 *pheS* 较 16S rRNA 基因更容易鉴定干酪乳杆菌及其近缘种。而 *pheS* 基因不能有效区分 *L. paracasei* subsp. *tolerans* 和 *L. paracasei* subsp. *paracasei* 2 个亚种。乌日拉嘎等^[29]对比研究了 16S rRNA 基因以及 *pheS*、*pyrG* 看家基因对植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*) 及其近缘种的鉴定能力, 结果表明将 *pheS* 和 *pyrG* 部分基因序列串联使用后, 植物乳杆菌及其近缘种间分类关系更加明晰。在此基础上, 采用看家基因(*uvrC*-*murE*)串联序列对干酪乳杆菌及其近缘种进行分类鉴定, 研究发现 *uvrC*、*murE* 和联合基因(*uvrC*-*murE*)对模式菌株 *L. paracasei* subsp. *tolerans* 和 *L. paracasei* subsp. *paracasei* 2 个亚种的平均差异性分别为 1.98%、0.20%、1.04%, 均能有效区分以上 2 个模式菌株。*L. zeae* DSM20178^T 和 *L. casei* DSM20011^T 的 16S rRNA 基因差异性仅为 0.11%, 而 *uvrC*、*murE* 和联合基因(*uvrC*-*murE*)的基因差异性分别为 20.78%、31.43%、21.56%, 成功将 2 个模式菌株区分开。

本研究通过比较由 16S rRNA 基因、*uvrC*、*murE* 和联合基因(*uvrC*-*murE*)看家基因构建的系统发育树发现, 看家基因与 16S rRNA 基因表现出了较高的一致性。但基于 16S rRNA 基因序列不能区分干酪乳杆菌的近缘种及亚种, 而看家基因 *uvrC*、*murE*、联合基因(*uvrC*-*murE*)基因序列均能够很好的区分干酪乳杆菌的近缘种及亚种。其中, 联合基因(*uvrC*-*murE*)的区分能力高于 *uvrC* 和 *murE* 基因。综上所述, 联合基因(*uvrC*-*murE*)可优化看家基因 *uvrC* 和 *murE* 的优点和不足, 可作为 16S rRNA 基

因的辅助工具用于干酪乳杆菌的近缘种及亚种间的快速分类鉴定。本研究为我国优良益生菌株的筛选及快速鉴定奠定坚实的理论基础。

REFERENCES

- [1] Wang S, Liang HZ, Jia CF, et al. Comparative genomics analysis of carbon metabolism of *Lactobacillus casei* 12A[J]. Microbiology China, 2015, 42(2): 315-324 (in Chinese)
王松, 梁宏彰, 贾春风, 等. 干酪乳杆菌 12A 碳源代谢的比较基因组学分析[J]. 微生物学通报, 2015, 42(2): 315-324
- [2] Bao QH, Song YQ, Xu HY, et al. Multilocus sequence typing of *Lactobacillus casei* isolates from naturally fermented foods in China and Mongolia[J]. Journal of Dairy Science, 2016, 99(7): 5202-5213
- [3] Xiao LL, Dong MS. Screening and cholesterol-degrading activity of *Lactobacillus casei* KM-16[J]. China Dairy Industry, 2003, 31(6): 7-10 (in Chinese)
肖琳琳, 董明盛. 干酪乳杆菌 KM-16 的筛选及其降胆固醇活性研究[J]. 中国乳品工业, 2003, 31(6): 7-10
- [4] Lei H, Li XL, Zhuang HJ, et al. Studies on antimicrobial substance produced by *Lb. paracasei* HD1.7[J]. Industrial Microbiology, 2007, 37(4): 16-19 (in Chinese)
雷虹, 李秀凉, 庄海雾, 等. 副干酪乳杆菌 HD1.7 产生抗菌物质的初步研究[J]. 工业微生物, 2007, 37(4): 16-19
- [5] Zhang JC, Guo Z, Sun ZH, et al. The effects of probiotic on human intestinal microbiota — taking *Lactobacillus casei* Zhang as example[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2011, 11(9): 58-68 (in Chinese)
张家超, 郭壮, 孙志宏, 等. 益生菌对肠道菌群的影响——以 *Lactobacillus casei* Zhang 研究为例[J]. 中国食品学报, 2011, 11(9): 58-68
- [6] Wang JC, Guo Z, Yan LY, et al. Comparison of transit tolerance and fermentation properties of probiotic *Lactobacillus casei* Zhang with commercial probiotic strains[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2009, 9(5): 14-23 (in Chinese)
王记成, 郭壮, 闫丽雅, 等. 益生菌 *Lactobacillus casei* Zhang 与商业益生菌对胃肠转运耐受性及发酵特性的比较[J]. 中国食品学报, 2009, 9(5): 14-23
- [7] Wu R, Sun Z, Wu J, et al. Effect of bile salts stress on protein synthesis of *Lactobacillus casei* Zhang revealed by 2-dimensional gel electrophoresis[J]. Journal of Dairy Science, 2010, 93(8): 3858-3868
- [8] Du RT, Tuo Y, Zhang HP. Influence of *Lactobacillus casei* Zhang on immunological function of intestinal mucosa associated lymphoid tissues of mice[J]. Acta Nutrimenta Sinica, 2009, 31(4): 396-399 (in Chinese)
杜瑞亭, 托娅, 张和平. 干酪乳杆菌 Zhang 对小鼠肠道免疫功能的影响[J]. 营养学报, 2009, 31(4): 396-399
- [9] Wang JG, Meng HBLG, Zhang HP, et al. Effect of *L. casei* Zhang on anti-oxidative ability in rats[J]. Acta Nutrimenta Sinica, 2009, 31(1): 63-65 (in Chinese)
- 王俊国, 孟和毕力格, 张和平, 等. 干酪乳杆菌 Zhang 对大鼠抗氧化能力的影响[J]. 营养学报, 2009, 31(1): 63-65
- [10] Collins MD, Phillips BA, Zannoni P. Deoxyribonucleic acid homology studies of *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* sp. nov., subsp. *paracasei* and subsp. *tolerans*, and *Lactobacillus rhamnosus* sp. nov., comb. nov.[J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 1989, 39(2): 105-108
- [11] Dellaglio F, Dicks LMT, Toit MD, et al. Designation of ATCC 334 in place of ATCC 393 (NCDO 161) as the neotype strain of *Lactobacillus casei* subsp. *casei* and rejection of the name *Lactobacillus paracasei* (Collins et al., 1989)[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 1991, 41(2): 340-342
- [12] Dicks LMT, Du Plessis EM, Dellaglio F, et al. Reclassification of *Lactobacillus casei* subsp. *casei* ATCC 393 and *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 15820 as *Lactobacillus zeeae* nom. rev., designation of ATCC 334 as the neotype of *L. casei* subsp. *casei*, and rejection of the name *Lactobacillus paracasei*[J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 1996, 46(1): 337-340
- [13] Dellaglio F, Felis GE, Torriani S. The status of the species *Lactobacillus casei* (Orla-Jensen 1916) Hansen and Lessel 1971 and *Lactobacillus paracasei* Collins et al. 1989. Request for an opinion[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2002, 52(1): 285-287
- [14] Judicial Commission of the International Committee on Systematics of Bacteria. The type strain of *Lactobacillus casei* is ATCC 393, ATCC 334 cannot serve as the type because it represents a different taxon, the name *Lactobacillus paracasei* and its subspecies names are not rejected and the revival of the name '*Lactobacillus zeeae*' contravenes rules 51b (1) and (2) of the international code of nomenclature of bacteria. Opinion 82[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2008, 58(7): 1764-1765
- [15] Singh S, Goswami P, Singh R, et al. Application of molecular identification tools for *Lactobacillus*, with a focus on discrimination between closely related species: a review[J]. LWT - Food Science and Technology, 2009, 42(2): 448-457
- [16] Walter J, Tannock GW, Tilsala-Timisjarvi A, et al. Detection and identification of gastrointestinal *Lactobacillus* species by using denaturing gradient gel electrophoresis and species-specific PCR primers[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2000, 66(1): 297-303
- [17] Ryu CS, Czajka JM, Sakamoto M, et al. Characterization of the *Lactobacillus casei* group and the *Lactobacillus acidophilus* group by automated ribotyping[J]. Microbiology and Immunology, 2001, 45(4): 271-275
- [18] Dobson CM, Chaban B, Deneer H, et al. *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus*, and *Lactobacillus zeeae* isolates identified by sequence signature and immunoblot phenotype[J]. Canadian Journal of Microbiology, 2004, 50(7): 482-488
- [19] Mori K, Yamazaki K, Ishiyama T, et al. Comparative sequence analyses of the genes coding for 16S rRNA of *Lactobacillus casei*-related taxa[J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 1997, 47(1): 54-57
- [20] Liu GQ, Liu Y, Li H, et al. Species identification of the *Lactobacillus casei* group by *pheS* gene sequences analysis[J].

- Food and Fermentation Industries, 2011, 37(9): 94-97 (in Chinese)
刘光全, 刘勇, 李辉, 等. *pheS* 基因序列分析在干酪乳杆菌种群水平鉴定中的应用[J]. 食品与发酵工业, 2011, 37(9): 94-97
- [21] Wu RN, Zhang HP, Meng HBLG. 16S rDNA sequence and cluster analysis of *Lb. casei* Zhang and ZL12-1 isolated from koumiss[J]. China Dairy Industry, 2005, 33(6): 4-9 (in Chinese)
乌日娜, 张和平, 孟和毕力格. 酸马奶中乳杆菌 *Lb. casei* Zhang 和 ZL12-1 的 16S rDNA 基因序列及聚类分析[J]. 中国乳品工业, 2005, 33(6): 4-9
- [22] Yang YR, Ren Y, De LL, et al. Isolation and identification of Lactic acid bacteria from traditional cheese in the republic of Kalmykia in Russian[J]. China Dairy Industry, 2015, 43(9): 19-22 (in Chinese)
杨彦荣, 任艳, 德亮亮, 等. 传统奶酪样品中乳酸菌的分离鉴定[J]. 中国乳品工业, 2015, 43(9): 19-22
- [23] Jiang DM, Zhou XW, Tian XX, et al. Phylogenetic analysis of the 16S rRNA and HSP60 gene sequences of the morphology-based taxa of myxobacteria[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2008, 48(6): 711-716 (in Chinese)
蒋德明, 周秀文, 田晓翔, 等. 基于 16S rRNA 和 HSP60 基因序列分析粘细菌胞囊杆菌亚目形态分类的种属之间的亲缘关系[J]. 微生物学报, 2008, 48(6): 711-716
- [24] Felis GE, Dellaglio F, Mizzi L, et al. Comparative sequence analysis of a *recA* gene fragment brings new evidence for a change in the taxonomy of the *Lactobacillus casei* group[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2001, 51(6): 2113-2117
- [25] Feng SZ, Xu HY, Song YQ, et al. Phylogenetic analysis of closely related *Leuconostoc mesenteroides* species based on *dnaA* and *rpoB* gene homologues[J]. China Dairy Industry, 2016, 44(2): 8-11 (in Chinese)
冯淑贞, 徐海燕, 宋宇琴, 等. 肠膜明串珠菌及其近缘种 *dnaA* 和 *rpoB* 基因的系统发育分析[J]. 中国乳品工业, 2016, 44(2): 8-11
- [26] Huang CH, Lee FL, Liou JS. Rapid discrimination and classification of the *Lactobacillus plantarum* group based on a partial *dnaK* sequence and DNA fingerprinting techniques[J]. Antonie Van Leeuwenhoek, 2010, 97(3): 289-296
- [27] Zhao SY, Wang H, Zhang LD, et al. Identification and genetic diversity of *Lactobacillus casei* from traditional fermented milk based on *recA* gene[J]. China Dairy Industry, 2016, 44(7): 8-11 (in Chinese)
赵思雨, 王辉, 张立冬, 等. 利用 *recA* 基因对传统发酵乳中干酪乳杆菌群的鉴定和多样性分析[J]. 中国乳品工业, 2016, 44(7): 8-11
- [28] Yu J, Sun ZH, Liu WJ, et al. Phylogenetic study of *Lactobacillus acidophilus* group, *L. casei* group and *L. plantarum* group based on partial *hsp60*, *pheS* and *tuf* gene sequences[J]. European Food Research and Technology, 2012, 234(6): 927-934
- [29] Wu RLG, Xu HY, Song YQ, et al. Phylogenetic analysis of *Lactobacillus plantarum* and related species using partial housekeeping genes[J]. Modern Food Science and Technology, 2017, 33(1): 100-105 (in Chinese)
乌日拉嘎, 徐海燕, 宋宇琴, 等. 植物乳杆菌及其近缘种部分看家基因的系统发育分析[J]. 现代食品科技, 2017, 33(1): 100-105