

# 应用 TGGE 技术分析人肠道中双歧杆菌的组成

庞小燕<sup>1</sup> 张宝让<sup>2</sup> 魏桂芳<sup>1</sup> 赵立平<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup> 上海交通大学生命科学技术学院 上海 200240)

(<sup>2</sup> 山西大学生物技术研究所 太原 030006)

**摘 要** 用温度梯度凝胶电泳(TGGE)技术结合 16S rDNA 克隆、测序,对健康人肠道中双歧杆菌的组成进行了分析。10 例健康人肠道双歧杆菌的 TGGE 分析显示:人肠道内双歧杆菌的组成具有宿主特异性,不同人肠道双歧杆菌种的多样性和种类不同。通过对一健康儿童肠道双歧杆菌属特异性 PCR 扩增产物的测序及 TGGE 电泳行为的分析发现,该个体双歧杆菌 TGGE 图谱中的条带分别代表 *Bifidobacterium bifidum*、*B. infantis*、*B. longum*、*B. adolescentis*、*B. pseudocatenulatum* 等种和一新种,其中 *B. pseudocatenulatum*(假小链双歧杆菌)是大多数个体共有且较优势的种。用传统培养方法只检出 *B. pseudocatenulatum* 和 *B. longum* 两种。基于双歧杆菌属特异性 PCR 基础上的 TGGE 方法结合 16S rDNA 克隆文库分析可较灵敏、直观地反映人肠道中双歧杆菌的组成。

**关键词** 双歧杆菌 温度梯度凝胶电泳(TGGE) 粪便、16S rDNA 克隆文库

中图分类号:Q938 文献标识码:A 文章编号:1001-6209(2005)05-0738-06

双歧杆菌是一类严格厌氧的革兰氏阳性菌。作为人胃肠道菌群的优势成员,双歧杆菌与人的健康密切相关,在防止腹泻和肠道感染、缓和便秘、提高机体免疫力和促进维生素代谢等方面起着重要的生理作用<sup>[1]</sup>。据文献报道,与人相关的双歧杆菌主要有以下 12 种:青春双歧杆菌(*Bifidobacterium adolescentis*),婴儿双歧杆菌(*B. infantis*),长双歧杆菌(*B. longum*),两歧双歧杆菌(*B. bifidum*),短双歧杆菌(*B. breve*),链状双歧杆菌(*B. catenulatum*),假小链双歧杆菌(*B. pseudocatenulatum*),角双歧杆菌(*B. angulatum*),高卢双歧杆菌(*B. gallicum*),异形双歧杆菌(*B. inopinatum*),齿双歧杆菌(*B. dentium*)和龋齿双歧杆菌(*B. denticolens*),后 3 种主要发现于口腔<sup>[2]</sup>。一直以来,双歧杆菌的研究多是基于传统的培养方法和生理生化特性的鉴定<sup>[3,4]</sup>,这种方法较烦杂、欠准确,且双歧杆菌的厌氧特性决定其很难被培养,因此,用不依赖培养的分析方法对研究双歧杆菌有着重要的现实意义。国外已有多篇用针对双歧杆菌的种、属特异性引物和探针以及荧光原位杂交(FISH)、变性梯度凝胶电泳(DGGE)等方法检测双歧杆菌的报道<sup>[2,5,6]</sup>。本文运用基于双歧杆菌属特异性 PCR 基础上的温度梯度凝胶电泳(Temperature Gradient

Gel Electrophoresis, TGGE)方法来比较分析人肠道中双歧杆菌的组成,并结合构建 16S rDNA 克隆文库详细分析了一健康儿童肠道内各种双歧杆菌的组成和比例。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 样品采集** 采集 12 个健康成人(18~50 岁)和 8 个健康儿童(3~12 岁)的新鲜粪便样品 2g 以上,直接提取总 DNA 或 -70℃冷冻保存。

**1.1.2 主要试剂和仪器** *Taq* DNA 聚合酶为 Promega 公司产品;琼脂糖凝胶中 DNA 片段的回收和纯化采用 MO BIO 公司的 UltraClean™ 15 DNA 纯化试剂盒;构建克隆文库的载体为 Promega 公司的 pGEM-T easy 载体系统;限制性内切酶为 MBI Fermentas 公司产品。选择性培养双歧杆菌的 TPY 琼脂培养基购自中国腹泻病控制上海试剂供应研究中心。温度梯度凝胶电泳仪为 Biometra 公司 TGGE-Mini system,厌氧培养罐为 Merck 公司产品。

### 1.2 双歧杆菌特异性 PCR

**1.2.1 粪便微生物总 DNA 提取** 粪便样品的预处理及微生物总 DNA 的提取方法见文献[7]。

**1.2.2 双歧杆菌属特异性 PCR** 双歧杆菌属特异性

基金项目 国家自然科学基金项目(30370031)

\* 通讯作者。Tel:86-21-54743351; Fax:86-21-54743348; E-mail:lpzhao@sjtu.edu.cn

作者简介 庞小燕(1974-)女,河南人,讲师,主要从事微生物分子生态研究。E-mail:xy\_pang@126.com

收稿日期 2005-02-02,修回日期 2005-04-11

PCR 采用一对以 16S rDNA 为靶序列的引物 ,上游引物为 Bif164-f( 5'-GGGTGCTAATGCCCGATG-3' ) ,下游引物为 Bif662-r( 5'-CCACCGTTACACCGGGAA-3' )<sup>[2]</sup>。扩增体系( 25μL ) 20ng 粪便总 DNA , 0.2μmol/L 各引物 , 200μmol/L dNTP , 1.5 U *Taq* DNA 聚合酶及配套 1 × buffer 和 2mmol/L MgCl<sub>2</sub>。 PCR 反应条件 : 94℃ 5min ; 94℃ 30s , 62℃ 20s , 68℃ 40s , 35 个循环 , 68℃ 7min。目的片段大小约为 520bp。对进行 TGGE 分析的样品 ,双歧杆菌属特异性 PCR 反应采用引物 Bif164-f/Bif662-GC-( 即在反向引物 Bif662-r 的 5'端添加一 40bp 的富含 GC 的夹子 ,序列为 : 5'-CGCCCCGCCGCGCGCGCGGGCGGGGCGGGGCACGGGGGG-3' ) , 扩增体系和程序同上。

### 1.3 温度梯度凝胶电泳(TGGE)

TGGE 参见仪器说明书。双歧杆菌属特异性 PCR 产物于 8% 聚丙烯酰胺(含 8mol/L 尿素和 20% 甲酰胺)凝胶上进行电泳,温度梯度为 46 ~ 54℃, 150V 电泳 3h。电泳结束后 0.2% AgNO<sub>3</sub> 溶液染色, 方法按照 TGGE 使用说明。TGGE 图谱的聚类分析采用 UVI band/map 软件(UVItec)。

#### 1.4 16S rDNA 克隆文库分析

对 10 岁健康儿童肠道双歧杆菌的组成和比例进行了 16S rDNA 克隆文库分析。从 0.8% 琼脂糖凝胶中回收该个体双歧杆菌属特异性 PCR 产物并进行纯化。纯化产物利用 pGEM-T easy 载体系统进行连接, 然后转化大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 $\alpha$ , 建成克隆文库。挑取阳性克隆, 对其插入片段用 *Hinf* I 和 *Csp*6 I 进行双酶切并划分操作分类单元 (OTU)。将每一个 OTU 的代表克隆测序 (博亚生物技术公司), 并在 GenBank 数据库中进行相似性比对 (blastn)。测序了的插入片段分别在 TGGE 凝胶上电泳, 将其电泳位置与该个体双歧杆菌属特异性 PCR-TGGE 图谱进行比对, 从而确定 TGGE 图谱上每一条带代表的序列及双歧杆菌种类。

本实验测序克隆的序列均已提交 GenBank , 登录号分别为 : Bif1 ( AY987029 ) , Bif2 ( AY987030 ) , Bif18 ( AY987031 ) , Bif24 ( AY987032 ) , Bif32 ( AY987033 ) , Bif82 ( AY987034 ) ,

### 1.5 粪便中双歧杆菌的培养和鉴定

粪便中双歧杆菌的培养采用 TPY 琼脂培养基, 于厌氧培养罐中 37℃ 培养 48 ~ 72h。随机挑取单菌落 44 个, 以煮菌法快速获得 DNA<sup>[8]</sup>, 并进行 16S rDNA 全长的扩增, 扩增方法参见文献[9]。各菌株

的 16S rDNA 全长用 *Csp*6 I 和 *Hinf* I 进行双酶切并分型(Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis, ARDRA),每种类型分别测序以获取序列信息并进行分子鉴定。

## 2 结果

### 2.1 20 个个体粪便中双歧杆菌的检测

对 20 个健康个体粪便中的微生物进行双歧杆菌特异性 PCR 检测,结果显示,在 12 个成人样品中,有 10 个样品可用此方法扩增得到大小约 520bp 的目的片段,另外 2 个样品无此目的片段,表明这两个样品中无双歧杆菌或双歧杆菌数量低于本方法检测限度。在 8 个儿童样品中,有 7 个样品可检测到双歧杆菌而有 1 个样品未检测到。图 1 显示了 10 例不同人个体粪便样品中双歧杆菌特异性 PCR 扩增的结果。

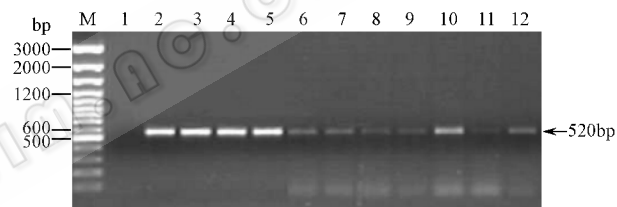


图1 不同人粪便样品中双歧杆菌特异性PCR检测

Fig.1 *Bifidobacteria* group-specific PCR detection in different human fecal samples

M.100bp DNA size marker ; 1. Negative control ; 2 ~ 11. Fecal samples of different human subjects ; 12. Positive control ( DNA of strain *Bifidobacterium* CCTCC AB94048 ).

## 2.2 健康人肠道菌群双歧杆菌 TGGE 图谱

选择 10 个双歧杆菌阳性的健康个体的粪样, 对其特异性扩增产物进行 TGGE 分析(图 2)。10 例个体双歧杆菌的 TGGE 图谱显示不同人肠道中双歧杆菌的组成不同, 这种差异主要表现在以下两方面:

(1) 不同个体双歧杆菌种的多样性不同, 表现为 TGGE 图谱中条带的数量不同。如个体 A 双歧杆菌 TGGE 图谱中约有 8 条带, 而个体 D 中仅有 3 条带。

(2) 不同个体双歧杆菌种的组成不同, 表现为 TGGE 图谱中条带的位置不同, 仅箭头所指条带为 9 例个体共有的一个优势条带(个体 I 除外)。聚类分析也显示, 多数个体双歧杆菌 TGGE 图谱的相似性不高, 聚类图较离散。但个体 A 和 B TGGE 图谱的相似性高达 93%, 说明这两个个体肠道内双歧杆菌的组成相似。

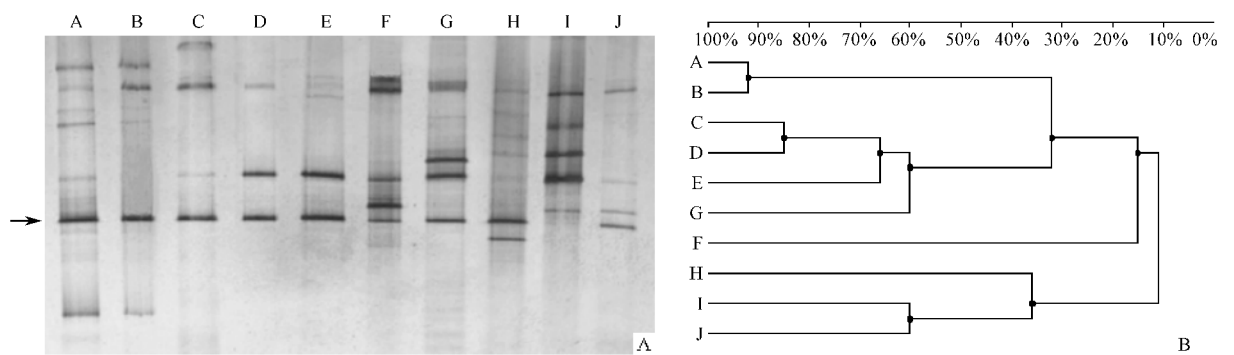


图 2 (A) 10 例个体肠道双歧杆菌 TGGE 图谱 ;(B) 左图中 TGGE 图谱相似性的聚类分析

Fig.2 (A) *Bifidobacterium* specific-TGGE profiles of 10 human individuals (A-J);(B) Cluster analysis for similarity coefficients of TGGE profiles in the left picture

2.3 16S rDNA 克隆文库分析 TGGE 条带中双歧杆菌的组成

个体 J 为一 10 岁健康儿童 ,该个体在实验前一年内未有肠道菌群紊乱症状出现并进行任何抗生素治疗 ,我们以此个体作为研究对象 ,通过分析 16S rDNA 克隆文库来确定 TGGE 各带所代表的双歧杆菌的方法。构建该个体双歧杆菌属特异性片段 (16S rDNA 的部分序列 )的克隆文库 ,对 80 个随机挑取的阳性克隆的插入片段进行 *Hinf* I 和 *Csp6* I 双酶切分析 ,酶切图谱显示可分为 6 种类型 ,其代表克隆分别为 Bif1 , Bif2 , Bif18 , Bif24 , Bif32 和 Bif82。对这 6 种代表克隆的插入片段进行测序 ,并分别进行 TGGE 电泳 ,同时与该个体肠道双歧杆菌属的 TGGE 图谱进行比对 ,从而确定 TGGE 图谱上各条带所代表的双歧杆菌的种的序列信息。

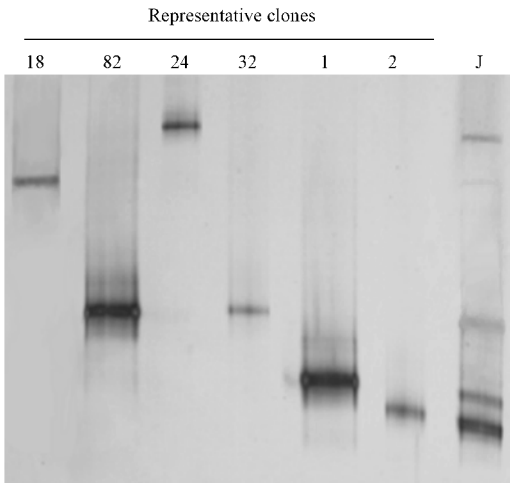


图 3 个体 J 肠道中双歧杆菌 TGGE 图谱中各条带代表菌种的确定

Fig.3 Species identity of bands in the *Bifidobacteria*-specific TGGE pattern of individual J via sequence analysis of amplicons

Listed are the nearest species of the clones corresponding to the bands , their percent identity and richness in the whole clone library.

18 82 24 32 1 2 represented clone Bif18 , Bif82 , Bif24 , Bif32 , Bif1 and Bif2 respectively. J represented the fecal sample of individual J.

图 3 列出了健康儿童 J 肠道内双歧杆菌 TGGE 图谱上各条带所代表序列的最接近种以及此类型在整个文库中所占的比例。该儿童双歧杆菌 TGGE 图谱上共有 5 条条带 (条带 I , II , III , IV , V ) ,其中条带 I 、 II 、 IV 、 V 分别对应代表克隆 Bif24 , Bif18 , Bif1 和 Bif2 ,相应序列分别为两权双歧杆菌 (100% 同源 ) 婴儿双歧杆菌 (100% 同源 ) 青春双歧杆菌 (98% 同源 ) 和假小链双歧杆菌 (100% 同源 )。条带 III 对应两种克隆 ,含有两种序列 ,一种与 GenBank 中的序列同源性较低 ,仅 95% 同源于婴儿双歧杆菌 ,据文献报道 ,一段 16S rDNA 序列若在已公开序列数据库中与其最近的邻居同源性低于 97% 或 98% ,则可视作为一种新种<sup>[10, 11]</sup> ;另一种与长双歧杆菌 99% 同源。这种不同序列组成的 DNA 在 DGGE/TGGE 凝胶中“共电泳”的现象在多篇文献中已有报道<sup>[12, 13]</sup>。

Nearest species	Identity /%	Richness /%
I — <i>B.bifidum</i>	100	18.8
II — <i>B.infantis</i>	100	1.3
III $\left\{ \begin{array}{l} B.bifidum \\ B.longum \end{array} \right.$	95 99	2.5 6.3
IV — <i>B.adolescentis</i>	98	20.0
V — <i>B.pseudocatenumulatum</i>	100	51.3

## 2.4 培养方法分析粪便中双歧杆菌的组成

作为对照,本文对个体 J 粪便中的双歧杆菌同时进行了传统的分离培养。TPY 培养基分离结果显示该个体粪便中双歧杆菌总数为  $2.85 \times 10^9$ /g 湿重粪便。随机挑取 44 个单菌落,扩增其 16S rDNA 序列全长,ARDRA 分型显示这些菌落可分为两种类型(图 4)类型 I 占 91%,对应菌落 1.0~1.5mm,乳白色,凸起,光滑;类型 II 占 9%,菌落 1.0~1.5mm,颜色灰白,光滑,略扁平。对此两种类型的双歧杆菌 16S rDNA 测序分析,类型 I 为假小链双歧杆菌(99% 同源),类型 II 为长双歧杆菌(100% 同源)。

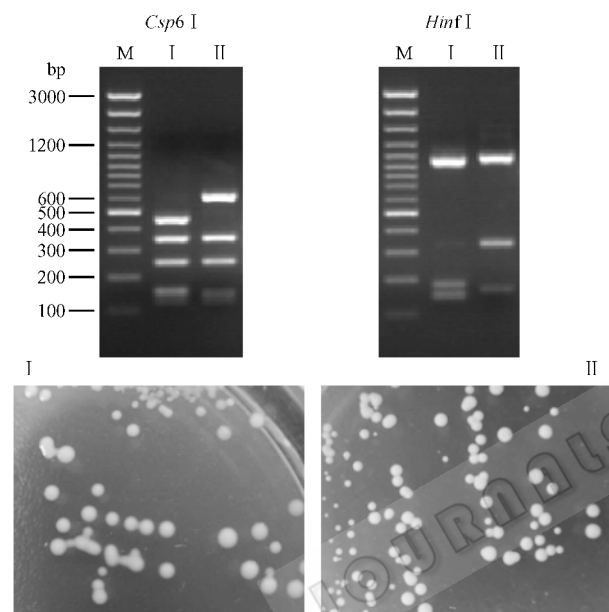


图 4 TPY 培养基分离得到的两种双歧杆菌(I 和 II)的 16S rDNA 酶切(*Csp6 I* 和 *Hinf I*)图谱及对应菌落形态

Fig. 4 ARDRA patterns of two *Bifidobacterium* species isolated from TPY medium and their corresponding colonies

M, 100bp DNA ladder; I and II represented two *Bifidobacterium* strains respectively.

## 3 讨论

自 1993 年 Muiyzer 首次将变性梯度凝胶电泳(DGGE)引入微生物生态学领域至今, TGGE/DGGE 技术已成功应用于多种复杂微生物群落的菌群组成及遗传多样性的研究,如土壤、温泉、河流、人及动物胃肠道系统等<sup>[12, 14~16]</sup>。该方法简便、快捷,重复性强,可同时分析大量样品,因此在平行比较不同微生物群落的组成差异和动态监测某一微生物群落随时空变化方面有显著优势。目前常用的 TGGE/DGGE 技术多是针对 16S rDNA 可变区域对微生物群落中的所有细菌(种群比例  $\geq 1\%$ )进行分析,因此对一些

细菌组成非常丰富的微生物群落, TGGE/DGGE 图谱则会因过于复杂而难以分析。

近年来,针对某些优势或重要种属而发展起来的类群特异性 PCR 基础上的 TGGE/DGGE 技术逐渐被引入到复杂微生物群落结构的研究中来。该方法是有选择性地针对微生物群落中的某一类细菌进行特异性 PCR 扩增,再将扩增产物在 TGGE/DGGE 胶上分离并解析该类群中的细菌组成。目前在环境微生物群落分析中,国外研究工作者已建立了针对氨氧化菌、硫化菌、芽孢杆菌、类芽孢杆菌等类群的 TGGE/DGGE 研究方法并获得了大量信息<sup>[17~20]</sup>。肠道菌群方面国外也有多篇用 TGGE/DGGE 研究乳酸菌、双歧杆菌、拟杆菌等属的报道<sup>[2, 21, 22]</sup>。国内在这方面还未见有报道。

本文用 TGGE 方法对 10 个健康人粪便样品中的双歧杆菌进行了分析,结果表明人肠道中双歧杆菌的组成具有宿主特异性,不同个体中双歧杆菌种的多样性及组成不同,此结果与 Mangin 等用选择性培养方法<sup>[23]</sup>、Kimura 用脉冲场凝胶电泳(PFGE)以及 Satokari 用 DGGE 方法研究人肠道中双歧杆菌组成得到的结果类似<sup>[2, 24]</sup>。实验过程中多数样品的 TGGE 分析重复了 3 次以上,得到了一致的 TGGE 图谱,显示该方法有较好的重复性。用 PCR-TGGE 指纹图技术研究双歧杆菌的组成,具有直观的特点,可直接观察不同个体肠道中双歧杆菌的多样性及组成差异。再结合对双歧杆菌特异性片段的测序分析及单个克隆插入片段的 TGGE 电泳行为的分析,即可确定 TGGE 图谱中每一条带所代表的双歧杆菌的种类。我们用此法对一健康儿童肠道内双歧杆菌的组成进行了剖析,结果显示该个体肠道内含有两权双歧杆菌、婴儿双歧杆菌、长双歧杆菌、青春双歧杆菌、假小链双歧杆菌及一种可能的新种,其中假小链双歧杆菌为最优势的种类,占双歧杆菌总数的 51.3%。青春双歧杆菌和两权双歧杆菌也是该个体肠道内双歧杆菌的主要类型,各占 20% 和 18.8%。另外,结合图 2 所显示的结果,10 例健康人个体中有 9 例个体共有一条条带,对应于个体 J 的条带 V,由此可推测 *B. pseudocatenulatum*(假小链双歧杆菌)是多数健康人肠道内共有的一个种。

大量已有研究结果显示 *B. adolescentis*(青春双歧杆菌)是人肠道中最常见的双歧杆菌<sup>[2, 25, 26]</sup>,这与本实验得到的结果不一致。1999 年 Matsuki 等<sup>[27]</sup>采用针对不同种的双歧杆菌设计的特异性引物和 PCR 方法研究了人肠道中各种双歧杆菌的组成,发现 *B.*

*pseudocatenulatum* (假小链双歧杆菌) 和 *B. catenulatum* (链状双歧杆菌) 是人肠道中最常见的一类双歧杆菌, 约 92% 的成人粪便样品中都含有这类菌, 其次才是 *B. longum* (长双歧杆菌) 和 *B. adolescentis* (青春双歧杆菌)。Matsuki 分析这种检测结果的不一致现象可能是由于传统的碳源发酵实验不能区分青春双歧杆菌和假小链双歧杆菌所致<sup>[27]</sup>。随后, Requena 和 Sakamoto<sup>[28, 29]</sup>的工作也相继证实假小链双歧杆菌类是人肠道中的一种主要双歧杆菌。2004 年, Matsuki<sup>[30]</sup>又采用定量 PCR 和荧光原位杂交 (FISH) 的方法对人肠道中双歧杆菌的组成进一步进行了检测, 确认假小链双歧杆菌和链状双歧杆菌类是肠道中最常见的一类双歧杆菌, 但在数量上这类菌并不一定是最优势菌。46 例分析个体中, 19 例个体肠道中以假小链双歧杆菌类为最优势种, 而 25 例个体中以青春双歧杆菌为最优势种。本研究用双歧杆菌属特异性 PCR-TGGE 方法分析健康人肠道双歧杆菌组成发现, 假小链双歧杆菌不仅是 10 例分析个体中最常见的一类双歧杆菌, 而且在多数个体中 (如个体 A、B、C、D、E、H、J) 也是数量上的优势菌 (图 2)。目前本实验以及相关文献的有限数据还不能表明人种、膳食结构、年龄、性别等因素对肠道中双歧杆菌的组成有否影响以及如何影响。

本实验用 TGGE 研究双歧杆菌, 较之 DGGE 方法可以显著节约样品 DNA。通常用于 TGGE 分析的 DNA 仅需 10 到几十纳克, 而 DGGE 一般需 180 ~ 300 ng PCR 产物, 对一些肠道内双歧杆菌含量较少的个体的样品, TGGE 分析则显得更为方便、经济。本研究得到的 6 种已测了序的双歧杆菌特异性片段, 基本代表了一些常见的肠道双歧杆菌种类, 这些 DNA 片断的混合物可制成 TGGE 分析的“marker”, 在手头没有一系列双歧杆菌标准菌株的情况下, 电泳时可点在待分析样品旁边作为 TGGE 电泳时的参照, 以提供一些条带的序列信息。

传统的培养方法检测出该个体肠道中有两种双歧杆菌——*B. pseudocatenulatum* (假小链双歧杆菌) 和 *B. longum* (长双歧杆菌)。由此可见, 本实验所采用的 TPY 双歧杆菌选择性培养基对粪便中双歧杆菌的分离具有偏好性, 一些用分子方法可检测到的种类如两歧双歧杆菌、婴儿双歧杆菌、青春双歧杆菌等在本实验中用培养方法未检出。因此, 在检测的忠实性和灵敏度方面, 分子方法较之培养方法具有优越性。但同时也应指出, 培养方法可分离得到纯培养物, 且通过稀释涂布培养也可获取活菌数量

的信息, 而在此方面, 分子方法不能区分死、活细菌, 且通过 TGGE 结合克隆测序, 虽可获得各种双歧杆菌所占的丰度, 却不可知样品中含有双歧杆菌的总数量, 因此, 分子方法和培养方法是互为补充, 二者结合可更有效地获取样品的微生物组成信息。

总之, 用基于双歧杆菌属特异性 PCR 基础上的 TGGE 方法结合 16S rDNA 克隆文库分析可较灵敏、直观地反映人肠道中双歧杆菌的组成, 该方法在并行比较不同微生物群落中双歧杆菌组成的差异并动态监测双歧杆菌组成的变化方面具有较强优势。

## 参 考 文 献

- [1] 徐 营, 李 霞, 杨利国. 双歧杆菌的生物学特性及对人体的生理功能. 微生物学通报, 2001, 28(6): 94–96.
- [2] Satokari R M, Vaughan E E, Akkermans A, et al. Bifidobacterial diversity in human feces detected by genus-specific PCR and denaturing gradient gel electrophoresis. Appl Environ Microbiol, 2001, 67(2): 504–513.
- [3] 马向前, 周德庆. 双歧杆菌和乳酸菌的一种简便快速计数法. 微生物学报, 1997, 37(1): 62–64.
- [4] 许本发, 王艳萍, 陈 莹. 耐氧双歧杆菌的分离和鉴定. 微生物学报, 1994, 34(1): 9–13.
- [5] 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. Appl Environ Microbiol, 1999, 65(10): 4506–4512.
- [6] Langendijk P, Schut F, Jansen G J, et al. Quantitative fluorescence in situ hybridization of *Bifidobacterium* spp. with genus-specific 16S rRNA-targeted probes and its application in fecal samples. Appl Environ Microbiol, 1995, 61(8): 3069–3075.
- [7] Wei G, Pan L, Du H, et al. ERIC-PCR fingerprinting-based community DNA hybridization to pinpoint genome-specific fragments as molecular markers to identify and track populations common to healthy human guts. J Microbiol Methods, 2004, 59(1): 91–108.
- [8] Wang R F, Cao W W, Cemiglia C E. PCR detection and quantitation of predominant anaerobic bacteria in human and animal fecal samples. Appl Environ Microbiol, 1996, 62(4): 1242–1247.
- [9] Di Cello F, Bevilino A, Chiarini L, et al. Biodiversity of a *Burkholderia cepacia* population isolated from the maize rhizosphere at different plant growth stages. Appl Environ Microbiol, 1997, 63(11): 4485–4493.
- [10] Favier C F, Vaughan E E, De Vos W M, et al. Molecular monitoring of succession of bacterial communities in human neonates. Appl Environ Microbiol, 2002, 68(1): 219–226.
- [11] Suau A, Bonnet R, Sutren M, et al. Direct analysis of genes encoding 16S rRNA from complex communities reveals many novel molecular species within the human gut. Appl Environ Microbiol, 1999, 65(11): 4799–4807.
- [12] Sekiguchi H, Watanabe M, Nakahara T, et al. Succession of bacterial community structure along the Changjiang river determined by denaturing gradient gel electrophoresis and clone library analysis. Appl Environ Microbiol, 2002, 68(10): 5142–5150.
- [13] Zhang X, Yan X, Gao P, et al. Optimized sequence retrieval from single bands of TGGE (temperature gradient gel electrophoresis) profiles of the amplified 16S rDNA fragments from an activated sludge systems. J Microbiol Methods, 2005, 60(1): 1–11.

- [ 14 ] Zoetendal E G , Akkermans A D , De Vos W M . Temperature gradient gel electrophoresis analysis of 16S rRNA from human fecal samples reveals stable and host-specific communities of active bacteria. *Appl Environ Microbiol* , 1998 , **64** ( 10 ) : 3854 – 3859 .
- [ 15 ] Ferris M , Muyzer G , Ward D . Denaturing gradient gel electrophoresis profiles of 16S rRNA-defined populations inhabiting a hot spring microbial mat community. *Appl Environ Microbiol* , 1996 , **62** ( 2 ) : 340 – 346 .
- [ 16 ] Simpson J M , McCracken V J , White B A , *et al* . Application of denaturing gradient gel electrophoresis for the analysis of the porcine gastrointestinal microbiota. *J Microbiol Methods* , 1999 , **36** ( 3 ) : 167 – 179 .
- [ 17 ] Brinkhoff T , Muyzer G . Increased species diversity and extended habitat range of sulfur- oxidizing *Thiomicrospira* spp. *Appl Environ Microbiol* , 1997 , **63** ( 10 ) : 3789 – 3796 .
- [ 18 ] Garbeva P . Predominant *Bacillus* spp. in agricultural soil under different management regimes detected via PCR-DGGE. *Microb Ecol* , 2003 , **45** : 302 – 316 .
- [ 19 ] Kowalchuk G A . Community analysis of ammonia-oxidising bacteria , in relation to oxygen availability in soils and root-oxygenated sediments , using PCR , DGGE and oligonucleotide probe hybridisation. *FEMS Microbiology Ecology* , 1998 , **27** : 339 – 350 .
- [ 20 ] Silva K R , Salles J F , Seldin L , *et al* . Application of a novel *Paenibacillus*-specific PCR-DGGE method and sequence analysis to assess the diversity of *Paenibacillus* spp. in the maize rhizosphere. *J Microbiol Methods* , 2003 , **54** : 213 – 231 .
- [ 21 ] Pang X , Ding D , Wei G , *et al* . Molecular profiling of *Bacteroides* spp. in human feces by PCR-temperature gradient gel electrophoresis. *J Microbiol Methods* , 2005 , **61** ( 3 ) : 413 – 417 .
- [ 22 ] Walter J , Tannock G W , Tilsala-Timisjarvi A , *et al* . Detection and identification of gastrointestinal *Lactobacillus* species by using denaturing gradient gel electrophoresis and species-specific PCR primers. *Appl Environ Microbiol* , 2000 , **66** ( 1 ) : 297 – 303 .
- [ 23 ] Mangin I , Bouhnik Y , Bisetti N , *et al* . Molecular monitoring of human intestinal *Bifidobacterium* strain diversity. *Res Microbiol* , 1999 , **150** ( 5 ) : 343 – 350 .
- [ 24 ] Kimura K , McCartney A L , McConnell M A , *et al* . Analysis of fecal populations of bifidobacteria and lactobacilli and investigation of the immunological responses of their human hosts to the predominant strains. *Appl Environ Microbiol* , 1997 , **63** ( 9 ) : 3394 – 3398 .
- [ 25 ] Moore W E C , Holdeman L V . Human Fecal Flora : The Normal Flora of 20 Japanese-Hawaiians. *Applied Microbiology* , 1974 , **27** ( 5 ) : 961 – 979 .
- [ 26 ] 吴拥军 , 王嘉福 , 尹峻峰 . 双歧杆菌的分离与鉴定. *西南农业学报* , 1997 , **10** ( 3 ) : 6 – 9 .
- [ 27 ] Scardovi V , Trovatielli L D , Biavati B , *et al* . *Bifidobacterium cuniculi* , *Bifidobacterium choerinum* , *Bifidobacterium boum* , and *Bifidobacterium pseudocatenulatum* : four new species and their deoxyribonucleic acid homology relationships. *Int J Syst Bacteriol* , 1979 , **29** : 291 – 311 .
- [ 28 ] Requena T , Burton J , Matsuki T , *et al* . Identification , detection , and enumeration of human *Bifidobacterium* species by PCR targeting the transaldolase gene. *Appl Environ Microbiol* , 2002 , **68** ( 5 ) : 2420 – 2427 .
- [ 29 ] Sakamoto M . Terminal restriction fragment length polymorphism analysis for human fecal microbiota and its application for analysis of complex bifidobacterial communities. *Microbiol Immunol* , 2003 , **47** ( 2 ) : 133 – 142 .
- [ 30 ] Matsuki T , Watanabe K , Fujimoto J , *et al* . Quantitative PCR with 16S rRNA-gene-targeted species-specific primers for analysis of human intestinal *Bifidobacteria* . *Appl Environ Microbiol* , 2004 , **70** ( 1 ) : 167 – 173 .

## Analysis of *Bifidobacteria* spp. composition in human gut via temperature gradient gel electrophoresis ( TGGE )

PANG Xiao-yan<sup>1</sup> ZHANG Bao-rang<sup>2</sup> WEI Gui-fang<sup>1</sup> ZHAO Li-ping<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup> School of Life Science and Biotechnology , Shanghai Jiao Tong University , Shanghai 200240 , China )

(<sup>2</sup> Institute of Biotechnology , Shanxi University , Taiyuan 030006 , China )

**Abstract** : Temperature Gradient Gel Electrophoresis ( TGGE ) method combined with 16S rDNA clone library profiling was used to analyze *Bifidobacteria* spp. composition in human gut in this study. *Bifidobacteria* group-specific TGGE patterns of 10 healthy human individuals showed that the *Bifidobacteria* population in humans was host-specific. The genomic diversity and species composition of *Bifidobacteria* in different individual was dissimilar. Through sequencing and TGGE comigration analysis of the *Bifidobacteria* group-specific amplicons for one healthy boy , it was revealed that the TGGE bands of this individual represented species *Bifidobacterium bifidum* , *B. infantis* , *B. longum* , *B. adolescentis* , *B. pseudocatenulatum* and one potentially new species , respectively. *B. pseudocatenulatum* was the most common species of tested samples. While as control , only two species- *B. pseudocatenulatum* and *B. longum* were isolated using traditional culture method. *Bifidobacteria* group-specific PCR based TGGE method combined with 16S rDNA clone library profiling is a sensitive and effective approach to resolve the population structure of *Bifidobacteria* in microflora of human intestinal tract.

**Key words** : *Bifidobacteria* , Temperature Gradient Gel Electrophoresis ( TGGE ) , Feces , 16S rDNA clone library profiling

Foundation item : National Natural Science Foundation of China ( 30370031 )

\* Corresponding author. Tel 86-21-54743351 ; Fax 86-21-54743348 ; E-mail : lpzhao@sjtu.edu.cn

Received date : 02-02-2005