

## 6种区分乳酸乳球菌乳酸亚种和乳酸乳球菌乳脂亚种的分子生物学方法比较

张家超, 王芳, 徐海燕, 于洁, 刘文俊, 包秋华, 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, 呼和浩特 010018)

**摘要:**【目的】比较并评价6种分子生物学技术对乳酸乳球菌乳酸亚种(*Lactococcus lactis* subsp. *lactis*)和乳酸乳球菌乳脂亚种(*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*)的区分效果。【方法】采用16S rRNA基因序列分析技术, 16S-23S rRNA间区序列多态性分析技术, 变性梯度凝胶电泳技术(DGGE), 随机扩增多态性分析技术(RAPD), 重复基因外回文序列分析技术(rep-PCR)和限制性酶切片多态性分析技术(RFLP)对4株*Lactococcus lactis* subsp. *lactis*和*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*参考菌株进行了区分, 并对这6种方法的区分效果进行了比较评价。【结果】16S rRNA基因序列分析技术, 16S-23S rRNA间区序列多态性分析技术无法区分*Lactococcus lactis* subsp. *lactis*和*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, 而其余4种技术可以实现区分。【结论】变性梯度凝胶电泳(DGGE), 随机扩增多态性分析技术(RAPD)耗时短, 操作简单, 试验结果准确稳定, 更适合*Lactococcus lactis* subsp. *lactis*和*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*的快速准确区分。

**关键词:** 乳酸乳球菌; 分类鉴定; 分子生物学方法

**中图分类号:** Q93-3    **文献标识码:** A    **文章编号:** 0001-6209 (2010) 12-1670-07

乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*)归属于硬壁菌门(Firmicutes)杆菌纲(Bacilli)乳杆菌目(Lactobacillales)链球菌科(Streptococcaceae)乳球菌属(*Lactococcus*)。其细胞呈球形或者卵圆形, 在液体培养基中成对或短链生长<sup>[1]</sup>。*Lactococcus lactis*包含有3个亚种, 分别是乳酸乳球菌乳酸亚种(*Lactococcus lactis* subsp. *lactis*), 乳酸乳球菌乳脂亚种(*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*)和乳酸乳球菌霍氏亚种(*Lactococcus lactis* subsp. *hordniae*), 而前两个亚种最初被鉴定归属于乳酸链球菌乳酸亚种(*Streptococcus lactis* subsp. *lactis*)和乳酸链球菌乳脂亚种(*Streptococcus lactis* subsp. *cremoris*), 直到1985年, 才由Schleifer等人重新划分为*Lactococcus lactis*的亚种<sup>[2]</sup>。

在乳制品的生产发酵过程中, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*和*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*发挥

了重要作用, 尤其是在干酪的生产过程中。通常情况下, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*被用来生产硬质干酪(特别是Cheddar干酪), 而*Lactococcus lactis* subsp. *lactis*则广泛应用于软质干酪的生产<sup>[3]</sup>。所以, 从工业生产和科学研究的角度, 对这两个亚种的区分就显得尤为重要。

早在1919年, Jensen等人便依靠表型特征对这两个亚种进行了区分, 可是区分效果并不理想<sup>[4]</sup>。近些年来, 随着科学技术的不断发展, 越来越多的科研工作者以核酸碱基排列顺序不同为契机, 从DNA结构层面, 应用各种分子生物学技术对这两个亚种进行了区分, 比如16S rRNA基因序列分析技术<sup>[5-7]</sup>, 16S-23S rRNA间区序列多态性分析<sup>[8-9]</sup>, 变性梯度凝胶电泳技术(DGGE)<sup>[10-11]</sup>, 随机扩增多态性分析技术(RAPD)<sup>[12-13]</sup>, 限制性酶切片多态性

基金项目: 国家自然科学基金项目(30660135, 30800861); 国家“863计划”(2006AA10Z345, 2007AA10Z353)

\* 通信作者。Tel: +86-471-4319940; Fax: +86-471-4300122; E-mail: hepingsdd@vip.sina.com

作者简介: 张家超(1986-), 男, 内蒙古包头人, 博士研究生, 研究方向为乳品生物技术。E-mail: zhjch321123@sohu.com

收稿日期: 2010-06-03; 修回日期: 2010-07-04

分析(RFLP)技术<sup>[14-15]</sup>以及重复基因外回文序列分析技术(rep-PCR)<sup>[16]</sup>。本文以 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 和 *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* 的4株参考菌株为研究对象,应用上述6种分子生物学技术对这两个亚种进行了区分,并对这6种方法的区分效果做出了比较和评价。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 试验参考菌株:**本试验以购买自中国普通微生物菌种保藏管理中心(CGMCC)的 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* AS 1.18 和 *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* AS 1.9, 以及美国标准菌种收藏所(ATCC)

的 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ATCC 19435 和 *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* ATCC19257 作为试验参考菌株。

**1.1.2 试验主要试剂和仪器:**伯乐公司变性梯度凝胶电泳仪(Dcode system), TGL-16B 型台式高速离心机, ND-1000 型微量紫外分光光度计, ML-30L 型全自动高压蒸汽灭菌器, HHSI-NI 恒温水浴槽, CDS8000 型 UPV 凝胶成像分析系统, DHP-9272 型电热恒温培养箱, HZS-H 水浴振荡器, PL303/01 电子天平, TGL-16G-A 型高速冷冻离心机, DG82 型干燥箱, PTC-200 型梯度基因扩增仪, 电泳仪, 本试验所用引物均由上海桑尼生物科技有限公司合成, 具体引物序列见表1。

表1 试验所用引物

Table 1 Primers used in this study

Method	Primer	Sequence (5'→3')	Reference
16S rRNA Gene analysis	A27F	CTACGGCTACCTTGTACGA	This work
	A1495R	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	This work
16S-23S rRNA ISRs Polymorphism	L1	GAAGTCGTAACAAGG	[9]
	G1	CAAGGCATCCACCGT	[9]
RFLP	Y1	TGGCTCAGGAGCAACGCTGGCCG	[21]
	Y2	CCTACTGCTGCCTCCCTAGGAGT	[21]
DGGE	V3F	CGCCCGCCGCGCGCGGGGGGGGGCGG GGGCACGGGGGCTACGGGAGGCAGCAG	[18]
	V3R	ATTACCGCGCTGCTGG	[18]
Rep-PCR	GTG5	GTGCTGCTGCTGCTG	[20]
RAPD	M13	GAGGGTGGCGGTTCT	[19]

### 1.2 菌株基因组 DNA 的提取

采用改良的 CTAB-冻融方法提取菌株基因组 DNA<sup>[17]</sup>,即用液氮反复冻融后进行提取。

### 1.3 16S rRNA 基因序列分析

使用实验室自主设计的引物 A27F 和 A1495R 对参考菌株的 16S rRNA 片段进行扩增,菌体扩增条件如下:94℃ 预变性 5 min;30 个循环:94℃ 变性 1 min,58℃ 退火 1 min,72℃ 延伸 2 min;72℃ 末端延伸 10 min。然后将扩增成功的产物寄往上海桑尼生物科技有限公司测序,将测序结果上传到 NCBI 并 BLAST 比对,最后应用 MEGA4.0 软件做出系统发育树完成同源性分析。

### 1.4 16S-23S rRNA 间区序列多态性分析 (16S-23S rRNA ISRs Polymorphism)

合成引物 L1 和 G1<sup>[9]</sup>,在 94℃ 预变性 5 min;25 个循环:94℃ 变性 1 min,55℃ 退火 2 min,72℃ 延伸 3 min;72℃ 末端延伸 10 min 的条件下扩增 4 株参考菌株的 16S-23S rRNA 间区序列,将扩增产物用 2% 的琼脂糖凝胶在电压 60 V 的条件下电泳 3 h,而后将电泳凝胶用溴化乙锭(EB)染色并分析电泳结果。

### 1.5 变性梯度凝胶电泳 (Denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE)

选用引物 V3F 和 V3R<sup>[18]</sup>,对参考菌株的 16S rRNA 基因的 V3 区进行扩增,并将 300 ng 扩增产物于 8% 的聚丙烯酰胺胶上进行分离,变性剂梯度范围为 32% - 57% (100% 的变性剂包含 7 mol/L 尿素和 40% 去离子甲酰胺)。电泳在恒温 60℃ 下 1 × TAE 缓冲液中进行,电压 200 V,时间 4 h。电泳结束后进行银染并对电泳图谱进行分析。

### 1.6 随机扩增多态性分析 (Random Amplified poly-morphism DNA, RAPD)

选取引物 M13<sup>[19]</sup>,在 94℃ 预变性 5 min;30 个循环:94℃ 变性 1 min,58℃ 退火 1 min,72℃ 延伸 2 min;72℃ 末端延伸 10 min 的条件下扩增参考 4 株菌株,将扩增产物用 2% 的琼脂糖凝胶在电压 80 V 的条件下电泳 2 h,而后将电泳凝胶用 EB 染色并分析电泳结果。

### 1.7 重复基因外回文序列分析技术 (( Repetitive extragenic palindromic-PCR, rep-PCR)

选取 4 种重复基因外回文序列中的 (GTG)5 重

复序列作为区分片段,合成引物 (GTG)<sub>5</sub><sup>[20]</sup>,在 94℃ 预变性 5 min;30 个循环:94℃ 变性 1 min,57℃ 退火 1 min,72℃ 延伸 2 min;72℃ 末端延伸 7 min 的条件下扩增 4 株参考菌株的 (GTG)<sub>5</sub> 重复序列,将扩增产物用 2% 的琼脂糖凝胶在电压 80 V 的条件下电泳 7 h,而后将电泳凝胶用 EB 染色并分析电泳结果。

### 1.8 限制性酶切片段多态性分析 (Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP)

合成引物 Y1 和 Y2<sup>[21]</sup>,在 1 个循环:94℃/3 min,55℃/45 s,70℃/1 min;30 个循环:94℃/45 s,55℃/45 s,70℃/1 min;1 个循环:94℃/45 s,

55℃/45 s,70℃/5 min. 的条件下扩增参考 4 株菌株,将扩增产物用限制性内切酶 MboII 在 37℃ 恒温水浴锅中酶切 3 h,随后将酶切产物在 8% 的聚丙烯酰胺凝胶上用 150 V 电压电泳 4 h,最后对凝胶进行银染分析。

## 2 结果

### 2.1 16S rRNA 基因序列分析

如聚类分析图 1 所示,参考菌株 ATCC19257 和 ATCC19435 的同源性高于 99%,所以 16S rRNA 基因序列分析技术无法准确的区分 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 和 *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*。

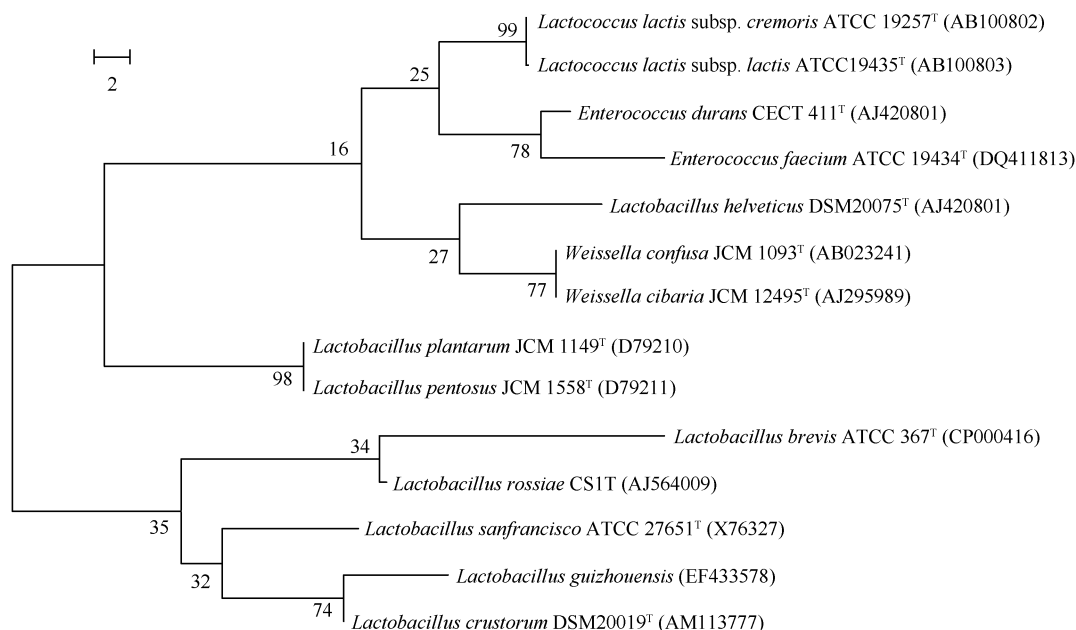


图 1 乳酸乳球菌乳酸亚种和乳脂亚种 16S rRNA 基因聚类分析图

Fig. 1 Phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences.

### 2.2 16S-23S rRNA 间区序列多态性分析

如图 2 所示,参考菌株 ATCC19257, AS1.9,

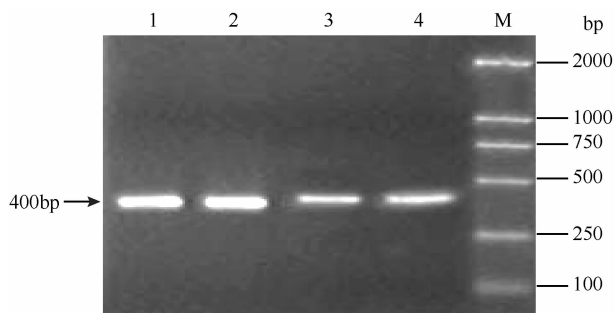


图 2 参考菌株 16S-23S rRNA 间区序列多态性分析凝胶电泳图

Fig. 2 Agarose gel electrophoresis of 16S-23S rRNA ISRs PCR products of the reference strains. M: DL2000 maker. Line 1: ACTT19435, Line 2: ACTT19257, Line 3: AS1.18, Line 4: AS1.9.

ATCC19435 和 AS1.18 的 16S-23S rRNA 间区序列多态性分析扩增片段大小均为 400 bp 左右,所以,应用 16S-23S rRNA 间区序列多态性分析技术无法有效的区分 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 和 *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*。

### 2.3 变性梯度凝胶电泳分析

从图 3 中我们可以看出,参考菌株 ATCC19257 和 AS1.9 处于相同的水平位置,而 ATCC19435 和 AS1.18 处于不同的水平位置,这说明 DGGE 技术能够有效区分这 2 个亚种。

### 2.4 随机扩增多态性分析

通过对琼脂糖凝胶电泳图 4 的分析不难发现,ATCC19257 和 AS1.9 的带型图谱类似,并和 ATCC19435,AS1.18 的带型图谱有明显区别,因此,通过使用引物 M13 的扩增,RAPD 技术能够清晰区

分这两个亚种。

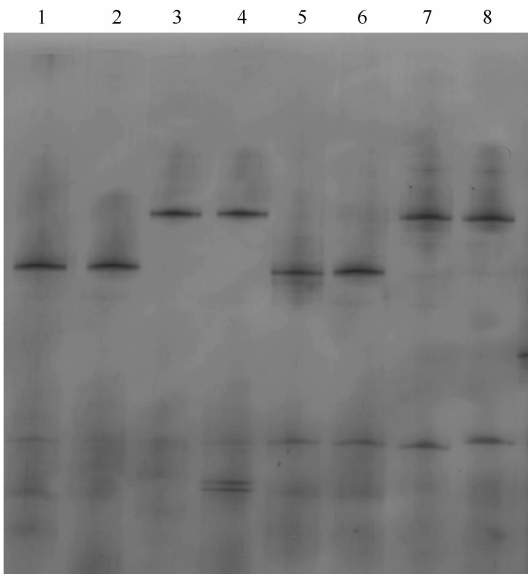


图3 乳酸乳球菌乳酸亚种和乳脂亚种参考菌株 DGGE 图谱

Fig.3 DGGE profiles of the reference strains of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* and *cremoris*. Line 1, 2: ACTT19435, Line 3, 4: ACTT19257, Line 5, 6: AS1. 18, Line 7, 8: AS1. 9.

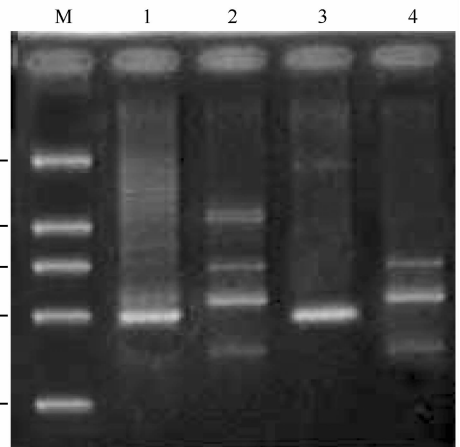


图5 参考菌株 rep-PCR 凝胶电泳图

Fig.5 Agarose gel electrophoresis of the (GTG)<sub>5</sub>-PCR products of the reference strains. M: DL2000 maker. Line 1: ACTT19257, Line 2: ACTT19435, Line 3: AS1. 9, Line 4: AS1. 18.

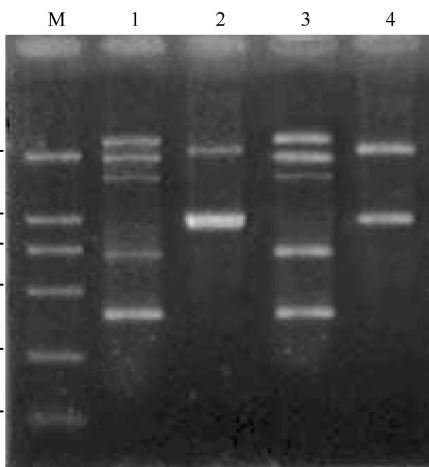


图4 乳酸乳球菌乳酸亚种和乳脂亚种参考菌株 RAPD 凝胶电泳图

Fig.4 RAPD agarose gel electrophoresis of the reference strains of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* and *cremoris*. M: DL2000 maker. Line 1: ACTT19435, Line 2: ACTT19257, Line 3: AS1. 18, Line 4: AS1. 9.

### 2.5 重复基因外回文序列分析

从琼脂糖凝胶电泳图5中,我们不难发现,乳酸乳球菌乳酸亚种和乳酸乳球菌乳脂亚种的带型有明显的区别,而相同的亚种之间具有相似的图谱,因此可以说明,通过对(GTG)<sub>5</sub>片段的扩增分析可以有效的对这两个亚种进行区分。

### 2.6 限制性酶切片段多态性分析

如聚丙烯酰胺凝胶图谱6所示,参考菌株 ATCC19435 和 AS1. 18 酶切电泳图谱完全一样,而参考菌株 ATCC19435 和 ATCC19257 酶切电泳图谱有明显不同,因此可以判断,通过引物 Y1Y2 的扩增,在限制性内切酶 MboII 的作用下,RFLP 技术完全可以准确区分这两个亚种。

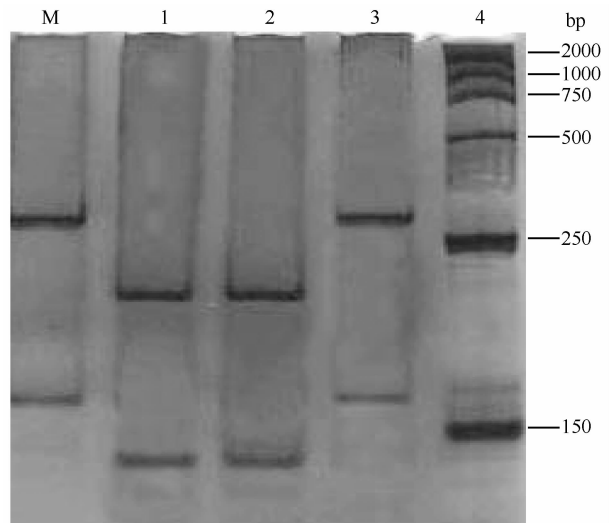


图6 参考菌株 RFLP 聚丙烯酰胺凝胶电泳图

Fig.6 RFLP profiles of the reference strains. M: DL2000 maker. Line 1: ACTT19435, Line 2: ACTT19257, Line 3: AS1. 9, Line 4: AS1. 18.

## 3 讨论

本研究验证并比较了6种用于区分 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 和 *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* 的分子生物学方法,在这6种方法中,变性梯度凝胶

电泳技术(DGGE),限制性酶切片多态性分析技术(RFLP),重复基因外回文序列分析技术(rep-PCR)以及随机扩增多态性分析技术(RAPD)可以区分这两个亚种,而16S rRNA基因序列分析技术和16S-23S rRNA间区序列多态性分析技术并不适用。

据 Blaiotta 研究表明, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 和 *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* 的 16S rRNA 全基因序列只在前 200 bp 中存在 9 - 10 个碱基的差异<sup>[9]</sup>,而 16S 序列全长 1500 bp 左右,因此,以 16S 序列全长为契机的 16S rRNA 基因序列分析技术是无法有效区分这两个亚种的,而反映到聚类图上我们更可以清楚的看到,两个亚种的同源性高达 99% 以上。1991 年, Koehler 应用传统生理生化鉴定的方法和 16S rRNA 基因序列分析技术对乳样中的乳酸菌进行了分离鉴定,鉴定结果亦无法将 *Lactococcus lactis* 区分到亚种水平<sup>[22]</sup>。虽然 Blaiotta 报道称,细菌的 16S-23S rRNA 基因间隔区存在的差异远远大于 16S rRNA 基因的差异,可以用于乳酸菌的分类鉴定<sup>[9]</sup>,但是从凝胶电泳图 2 中相似的带型我们可以看出,此方法并不适用于 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 和 *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* 的区分。这可能是由于上述两个亚种的全基因组序列高度相似,因此其 16S-23S rRNA 基因间隔区差异并不显著。

自 1993 年 Muzyer<sup>[18]</sup>首次将 DGGE 技术应用于微生物研究以来,近些年该技术得到迅猛发展,并被广泛的应用于微生物多样性分析及微生物种属鉴定。DGGE 技术灵敏度高,如果变性梯度选择合适,一个碱基的差异也可以区分开来。2007 年, Milica 等通过 PCR-DGGE 的方法成功鉴定了当地自制山羊奶干酪中的乳球菌<sup>[10]</sup>。2006 年, Spano 等运用 DGGE 技术成功分析了红葡萄酒中的酒类酒球菌 (*Oenococcus oeni*) 和植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*),并指出 *Lactobacillus plantarum* 是发酵初期的优势菌种<sup>[11]</sup>。而本试验所考察的 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 和 *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* 的 16S rRNA 基因序列确实存在 9 - 10 个碱基的差异,因此, DGGE 技术可以轻松将这两个亚种进行区分。

RAPD 是基于随机扩增多态性分析的技术, 2005 年, Klijn 曾比较了该技术和 RFLP 技术在乳杆

菌鉴定中的效果,最后得出结论称 RAPD 方法随机性大,可重复性差,并不适用于微生物的鉴定<sup>[23]</sup>。然而从本试验的琼脂糖凝胶电泳图 4 中不难发现, ATCC19257 和 AS1.9 带型相似,并明显区别于 ATCC19435 和 AS1.18,因此只要引物选择合适,这种技术还是十分有效的。

RFLP 技术是针对特定片段的扩增产物利用特定的限制性内切酶识别并切割的操作,如图 6 所示,本试验所选用的限制性内切酶从特定的酶切位点将参考菌株的扩增产物切割成大小不同的 DNA 片段,进而在聚丙烯酰胺凝胶中实现了这两个亚种的区分。相似研究在国内外有大量报道:2003 年, Elif 等<sup>[24]</sup>应用 RFLP 技术对分离自当地的酸酪中的 150 株乳酸菌进行分类研究,并与 9 株标准菌株 RFLP 图谱比较分析,在种的水平上对其进行了鉴定。2002 年 Giraffa 等人<sup>[14]</sup>对分离自当地不同乳制品中的 35 株德式乳杆菌保加利亚亚种 (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*) 进行了鉴定;并通过比较使用 RFLP 蛋白基因编码技术与 16S rRNA 序列分析技术最终得出结论,RFLP 蛋白基因编码技术在亚种水平的鉴定中较之 16S rRNA 序列分析技术更为有效。

重复基因外回文序列分析技术(rep-PCR)是以 PCR 为基础发展起来的一种针对原核生物的 DNA 指纹图谱技术。rep-PCR 技术的原理是利用特定的引物扩增细菌基因组 DNA 的重复序列,这些序列在进化过程中高度保守,扩增位于这些序列之间的不同区域可得到不同的图谱,扩增产物经凝胶电泳便可以分析其多态性。基于以上原理,如本试验图 5 所示,应用(GTG)<sub>5</sub>引物可以实现区分这两个亚种。

虽然 DGGE 技术, RAPD, RFLP 技术和 rep-PCR 技术均可以区分 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 和 *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*,但是我们在试验中发现,rep-PCR 技术存在一定的随机性,即每次扩增的条带数量并不一致,带型分布也不尽相同,且该方法的重现性并不理想,电泳耗时太长,因此不建议使用。而 RFLP 技术虽然稳定性和重现性都比较好,且分离图谱相当清晰,但是考虑到这种方法的试验耗材较贵,每次试验的耗时较长,且对实验人员操作手法要求较高,这种方法亦不适用于 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 和 *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* 的快速区分。在本研究中,我们认为 DGGE 技术和

RAPD 技术稳定性好,重现性强,耗时较短,单位成本低,指纹图谱区别明显并清晰可辨。因此,推荐这两种技术作为 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 和 *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* 快速准确的鉴定手段。

总之,本研究所比较的 6 种分子生物学技术原理不同,操作方法不同,对 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 和 *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* 的区分效果也不尽相同。因此,从工业生产角度和科学研究角度,选择合适的手段区分这 2 个亚种就显得格外重要。DGGE 技术和 RAPD 技术较其他 4 种技术无论从区分效果还是从耗时耗力上来讲,都具有明显的优势,所以更适合 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 和 *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* 的快速准确区分。

## 参考文献

- [ 1 ] 张刚. 乳酸细菌——基础、技术和应用. 第一版. 北京:化学工业出版社,2007:60-61.
- [ 2 ] Schleifer KH, Kraus J, Dvorak C, Kilpper R, Collins MD, Fischer W. Transfer of *Streptococcus lactis* and related streptococci to the genus *Lactococcus* gen. nov. *Systematic and Applied Microbiology*, 1985, 6:183-195.
- [ 3 ] Holler BJ, Steele JL. Characterization of *Lactococci* other than *Lactococcus lactis* for possible use as starter cultures. *International Dairy Journal*, 1995, 5:275-289.
- [ 4 ] Jensen S. The lactic acid bacteria, Host, Copenhagen, 1919:1-196.
- [ 5 ] Parola P, Maurin M, Alimi Y, Juhan C, Brouqui P. Use of 16S rRNA gene sequencing to identify *Lactobacillus casei* in Septicaemia Secondary to a Paraprostatic Enteric Fistula. *European Journal Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 1998, 17:203-205.
- [ 6 ] Booyesen C, Dicks T, Meijering I. Isolation identification and changes in the composition of lactic acid bacteria during the malting of two different barley cultivars. *International Journal of Food Microbiology*, 2002, 76:63-73.
- [ 7 ] Corsetti A, Lavermicocca P, Morea M. Phenotypic and molecular identification and clustering of lactic acid bacteria and yeasts from wheat (species *Triticum-durum* and *Triticum-aestivum*) sourdoughs of Southern Italy. *International Journal of Food Microbiology*, 2001, 64:95-104.
- [ 8 ] Barry T, Colleran G, Glennon M, Dunican LK, Gannon F. The 16S/23S ribosomal spacer region as a target for DNA probes to identify eubacteria. *PCR Methods Applied*, 1991, 1:51-56.
- [ 9 ] Blaiotta G, Pepe O, Mauriello G. 16S-23S rDNA Intergenic Spacer Region Polymorphism of *Lactococcus garvieae*, *Lactococcus raffinolactis* and *Lactococcus lactis* as revealed by PCR and nucleotide sequence analysis. *Systematic and Applied Microbiology*, 2002, 25:520-527.
- [ 10 ] Nikolic M, Vidojevic A, Jovicic B, Golic N, Topisirovic L. Characterization of lactic acid bacteria isolated from Bukuljac, a homemade goat's milk cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 2008, 122:162-170.
- [ 11 ] Spano G, Lonvaud-Funel A, Claisse O, Massa S. Invivo PCR-DGGE analysis of *Lactobacillus plantarum* and *oenococcus oeni* populations in red wine. *Current Microbiology*, 2007, 54:9-13.
- [ 12 ] Schillinger U, Nuha M, Yousif K, Sesar L, Charles A, Franz P. Use of group-specific and RAPD-PCR analyses for rapid differentiation of *Lactobacillus* Strains from Probiotic yogurts. *Current Microbiology*, 2003, 47:453-456.
- [ 13 ] Spano G, Beneduce L, Depalma L, Quinto M, Vermile A, Massal S. Characterization of wine *Lactobacillus plantarum* by PCR-DGGE and RAPD-PCR analysis and identification of *Lactobacillus plantarum* strains able to degrade arginine. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2006, 22:769-773.
- [ 14 ] Giraffa G, Lazzi C, Gatti M, Rossetti L, Mora D, Neviani. Molecular typing of *Lactobacillus delbrueckii* of dairy origin by PCR-RFLP of protein-coding genes. *International Journal of Food Microbiology*, 2003, 82:163-172.
- [ 15 ] Antonsson M, Molin G, Ardo Y. *Lactobacillus* strains isolated from Danbo cheese as adjunct cultures in a cheese model system. *International Journal of Food Microbiology*, 2003, 85:159-169.
- [ 16 ] Versalovic J, Schneider M, Debruijn FJ. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Methods in Molecular and Cellular Biology*, 1994, 5:25-40.
- [ 17 ] 乌日娜, 张和平, 孟和毕力格. 酸马奶中乳杆菌 *L. casei* Zhang, ZL12-1 的 16S rDNA 基因序列及聚类分析. 中国乳品工业 (*China Dairy Industry*), 2005, 33(6):4-9.

- [18] Muyzer G, Waal EC, Uitterlinden AG. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*,1993,59(3):695-700.
- [19] Albano H, Carol A, Reenen, Svetoslav D, Todorov, Cruz D, Fraga L. Phenotypic and genetic heterogeneity of lactic acid bacteria isolated from "Alheira", a traditional fermented sausage produced in Portugal. *Meat Science*, 2009,82:389-398.
- [20] Mohapatra B, Broersma K, Mazumder A. Comparison five rep-PCR genomic finger printing methods for differentiation of fecal *Escherichia coli* from humans, poultry and wild birds. *FEMS Microbiology Letters*,2007, 277:98-106.
- [21] Lawrence JH, Julie CS, Graham P. Two methods for the genetic differentiation of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* and *cremoris* based on divergences in the 16S rRNA gene sequence. *FEMS Microbiology Letters*,1998,166:15-20.
- [22] Koehler G, Ludwig W, Schleifer KH. Differentiation of *Lactococci* by rRNA gene restriction analysis. *FEMS Microbiology Letters*,1991,84:307-312.
- [23] Klijn N, Weerkamp AH, Vos WM. Identification of mesospheric lactic acid bacteria by using polymerase chain reaction-applied viable regions of 16S rRNA and specie DNA probes. *Applied and Environmental Microbiology*,1991,57,3390-3393.
- [24] Yavuz E, Gunes H, Bulut C, Harsa S, Fazil A, Yenidunya. RFLP of 16S-ITS rDNA region to differentiate *Lactobacilli* at species level. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*,2004,20:535-537.

## Comparison of six molecular methods for differentiation of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* and *cremoris*

Jiachao Zhang, Fang Wang, Haiyan Xu, Jie Yu, Wenjun Liu, Qiuhua Bao  
Zhihong Sun, Heping Zhang\*

(Key Laboratory of Dairy Biotechnology and Bioengineering, Ministry of Education, Department of Food Science and Engineering, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018, China)

**Abstract:** [ **Objective** ] To compare six molecular methods for differentiation of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* and *cremoris*. [ **Methods** ] Six molecular methods, such as 16S rRNA gene analysis, 16S-23S rRNA Intergenic spacer region polymorphism, Denaturing Gradient Gel Electrophoresis ( DGGE ), Random Amplified Polymorphic DNA ( RAPD ), Repetitive Extragenic Palindromic-PCR and Restricted Fragment Length Polymorphisms were used to differentiate the reference strains. [ **Results** ] Except for 16S rRNA gene analysis and 16S-23S rRNA Intergenic spacer region polymorphism, the other protocols were competent. [ **Conclusion** ] The methods of DGGE and RAPD were more appropriate for differentiation of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* and *cremoris*.

**Keywords:** *Lactococcus lactis*; differentiation; molecular methods

( 本文责编: 张晓丽 )

Supported by the National Natural Foundation of China (30660135,30800861) and by the National Programs For High Technology Research and Development of China (2006AA10Z345,2007AA10Z353)

\* Corresponding author. Tel: +86-471-4319940 ; Fax: +86-471-4300122 ; E-mail: hepingdd@vip.sina.com

Received: 3 June 2010 / Revised: 4 July 2010