



母乳源乳双歧杆菌 Probio-M8 的遗传特征及基因组差异比较分析

李东宇¹, 李伟程¹, 康小红², 张和平¹, 孙志宏^{1*}

- 1 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, 内蒙古乳品生物技术与工程重点实验室, 内蒙古 呼和浩特 010018
- 2 内蒙古蒙牛乳业(集团)有限公司, 内蒙古 呼和浩特 011500

李东宇, 李伟程, 康小红, 张和平, 孙志宏. 母乳源乳双歧杆菌 Probio-M8 的遗传特征及基因组差异比较分析. 微生物学报, 2022, 62(7): 2768–2781.

Li Dongyu, Li Weicheng, Kang Xiaohong, Zhang Heping, Sun Zhihong. Genetic characteristics and functional genes of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Probio-M8 from breast milk. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(7): 2768–2781.

摘要:【目的】母乳源乳双歧杆菌(*Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*) Probio-M8 具有优良的益生特性, 本文拟从全基因组水平解析 Probio-M8 的遗传特征, 并与已有益生功效的乳双歧杆菌的基因组进行比较分析。【方法】本研究基于 NCBI 已公开的 21 株乳双歧杆菌和 1 株模式菌株 DSM10140^T 的基因组数据, 构建了核心基因集与泛基因集, 解析该群体的系统发育关系, 比较分析 Probio-M8 的遗传特征及功能基因组。【结果】22 株乳双歧杆菌的泛基因集包含 1 618 个基因, 其中核心基因 1 514 个, 占泛基因集的 93.57%, 表明乳双歧杆菌核心基因集高度保守。以 1 514 个核心基因构建系统发育树, 发现 22 株乳双歧杆菌分为两个分支, AD011 单独为一个分支, Probio-M8 和其他菌株与模式菌株 DSM10140^T 聚在同一分支, 且 Probio-M8 与 V9、BB-12、Bi-07、HN019 的遗传距离极为接近。进一步分析耐药基因和毒力基因, 在 Probio-M8 与 V9、BB-12、Bi-07、HN019 基因组上均检测到 *Dfr*A43、*tet*W 及 *rpo*B 3 种拷贝数完全一致的固有耐药基因, 且均不含毒力基因。碳水化合物代谢活性酶注释结果发现, Probio-M8 与 V9、Bi-07、BB-12 和 HN019 均编码 47 个碳水化合物代谢相关基因, 其中, Bi-07 缺少 *GH49* 基因, 且少一个 *GH13* 基因的拷贝, 而 Probio-M8 多一个 *GH49* 基因的拷贝, 显示 Probio-M8 与 V9、BB-12、Bi-07 和 HN019

基金项目: 国家现代农业产业技术体系; 内蒙古自治区科技重大专项(2021ZD0014)

Supported by the National Modern Agricultural Industry Technology System and by the Major Science Technology Project of Inner Mongolia Autonomous Region (2021ZD0014)

*Corresponding author. Tel: +86-471-4308703; Fax: +86-471-4305357; E-mail: sunzhihong78@163.com

Received: 12 November 2021; Revised: 26 January 2022; Published online: 18 March 2022

具有相似的碳水化合物代谢相关基因。【结论】本研究从全基因组水平完成了对 22 株乳双歧杆菌的比较分析, 发现乳双歧杆菌的核心基因集高度保守, Probio-M8 与 V9、BB-12、Bi-07 和 HN019 四株益生菌的遗传特征高度相似, 基因组差异较小, 为 Probio-M8 的后续研究提供数据支持。

关键词: 乳双歧杆菌; 比较基因组; 碳水化合物酶

Genetic characteristics and functional genes of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Probio-M8 from breast milk

LI Dongyu¹, LI Weicheng¹, KANG Xiaohong², ZHANG Heping¹, SUN Zhihong^{1*}

¹ Key Laboratory of Dairy Biotechnology and Engineering, Ministry of Education, Key Laboratory of Dairy Products Processing, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Inner Mongolia Key Laboratory of Dairy Biotechnology and Engineering, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018, Inner Mongolia, China

² Inner Mongolia Mengniu Dairy (Group) Co., Ltd., Hohhot 011500, Inner Mongolia, China

Abstract: [Objective] Breast milk-derived *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Probio-M8 has excellent probiotic properties. We analyzed the genetic characteristics of Probio-M8 at the genome-wide level and compared the genomes between Probio-M8 and other *B. animalis* subsp. *lactis* strains with probiotic efficacy. [Methods] We constructed the core gene set and pan gene set based on the genome data of 21 strains and 1 model strain DSM10140^T of *B. animalis* subsp. *lactis* in the NCBI database. Further, we constructed a phylogenetic relationship of this population and analyzed the genetic characteristics and functional genes of Probio-M8. [Results] The pan gene set of the 22 strains contained 1 618 genes, including 1 514 (93.57%) core genes, which indicated the core gene set was highly conserved. A phylogenetic tree was constructed based on the 1 514 core genes, which showed that AD011 was in a single branch, while Probio-M8 and the other strains were in the same clade with the type strain DSM10140^T. Probio-M8 had short genetic distance with V9, BB-12, Bi-07, and HN019. The genomes of Probio-M8, V9, BB-12, Bi-07, and HN019 carried three inherent resistance genes *dfrA43*, *tetW*, and *rpoB* with the same copy number among strains and did not contain virulence genes, which indicated the virulence and resistance genes were conserved. Furthermore, Probio-M8, V9, BB-12, and HN019 all had 47 carbohydrate metabolism-related genes. Bi-07 lacked *GH49* gene and one *GH13* gene copy, while Probio-M8 had an extra copy of *GH49* gene, which indicated that the 5 probiotic strains had similar genes for carbohydrate metabolism. [Conclusion] The core gene set is highly conserved among the 22 strains of *B. animalis* subsp. *lactis*. The strains Probio-M8, V9, BB-12, Bi-07, and HN019 have similar genetic characteristics. This article supplies data support for the follow-up studies of Probio-M8.

Keywords: *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*; comparative genomics; carbohydrase

双歧杆菌是一种革兰氏阳性菌^[1], 作为最早定植于人体肠道的一类微生物, 在调节肠道菌群平衡和促进肠道正常发育等方面具有重要作用^[2]。当婴儿自身的防御机制不成熟时, 双

歧杆菌可通过防止病原体粘附到肠上皮而起到防御效果^[3-4]。双歧杆菌又是肠道健康指示菌,其丰度受年龄、健康状况和精神压力等因素的影响^[5]。多项研究表明:双歧杆菌具有营养、抗肿瘤和抗衰老^[6-10]等多种益生功效。乳双歧杆菌可应用于食品中,卫生部第 25 号文规定,乳双歧杆菌 BB-12、Bi-07 和 HN019 可作为婴幼儿可食用的益生菌^[11]。

随着高通量技术的不断发展,测序成本降低,越来越多的菌株已经完成全基因组测序工作^[12]。比较基因组学(comparative genomics)是以相关物种基因组的相似性为基础,根据测序和基因组图谱,通过基因组信息推测基因数目、功能及表达机制的研究^[7]。利用比较基因组学可以构建物种核心基因组(core genome)和泛基因组(pan genome),通过讨论物种的直系同源序列从而分析其群体遗传和表型演化^[13]。

本团队研究发现,乳双歧杆菌 Probio-M8 对胃肠的消化液具有良好的耐受性,能够在人体肠道中存活^[13],并且可通过调节肠道微生物组和血清代谢组有效缓解哮喘症状^[14]。本文以 22 株乳双歧杆菌的全基因组序列作为研究对象,利用比较基因组学的方法解析 22 株乳双歧杆菌的基因组特征,从而进一步解析 Probio-M8 与 V9、BB-12、Bi-07、HN019 四株益生菌的遗传特征及功能基因组差异。

1 材料与方法

1.1 实验菌株

截至 2020 年 10 月 10 日,将在 NCBI (National Coalition Building Institute) Refseq 数据库中 22 株乳双歧杆菌全基因组完成图数据全部下载,其中动物双歧杆菌乳亚种 Probio-M8 (*Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, Probio-

M8), 于 2017 年分离自健康妇女的母乳。结合模式菌株 DSM10140^T, 计算平均核苷酸一致性(average nucleotide identity, ANI)后,去掉与模式菌株 ANI 值小于 95%的菌株,所用菌株如表 1 所示。

1.2 比较基因组学分析

1.2.1 平均核苷酸一致性(average nucleotide identity, ANI)和总核苷酸一致性(total nucleotide identity, TNI)值的计算

参考 Goris 等^[15]和 Chen 等^[16]的方法对 *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* 的 ANI 和 TNI 值进行计算。

1.2.2 构建核心基因组、泛基因组

基于 Prokka^[17]软件对菌株基因组进行基因预测后,采用 Roary^[18]软件识别核心基因组和附属基因组(accessory gene),其中以编码蛋白的氨基酸相似性大于 95%的原则识别核心基因,核心基因组是存在于所有菌株基因组中共有的基因,仅在 1 个菌株中出现的基因称为特有基因。所有基因的总和称为泛基因组^[19]。

1.2.3 核心基因系统发育树分析

得到的核心基因序列使用网站 ITOL (<https://itol.embl.de/login.cgi>), 利用邻接法(neighbor-joining, NJ)进行可视化,以探究 22 株乳双歧杆菌的系统发育关系。

1.2.4 共线性、耐药基因及毒力基因分析

基于 Mauve^[20]软件对 Probio-M8 与 V9、BB-12、Bi-07、HN019 全基因组序列进行共线性分析。将 Probio-M8 与 V9、BB-12、Bi-07、HN019 的全基因组与耐药基因数据库(CARD)和毒力基因数据库(VFDB)进行比对。

1.2.5 SNPs 结果分析

以 Probio-M8 全基因组序列为参考,使用 mummer 软件对 Probio-M8 与 V9、BB-12、Bi-07、HN019 进行 SNP 分析。

表 1 22 株乳双歧杆菌登录号及分离源

Table 1 Accession numbers and isolation sources of 22 strains of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*

Strains	GenBank No.	Isolation sources
BLC1	CP003039.2	Human feces
IDCC4301	CP031703.1	Infant feces
S7	CP022724.1	Adult feces
BF052	CP009045.1	Feces of breast-fed infant
HN019	CP031154.1	Human feces
A6	CP010433.1	Human feces
MGYG-HGUT-02459	LR699002.1	Human gut
BL3	CP017098.1	Commercial dietary supplements
B06	CP042940.1	Feces of healthy Chinese centenarian
Probio-M8	CP047190.1	Breast milk
1	CP035497.1	Human feces
RH	CP007755.1	Human feces
BB-12	CP001853.2	Food matrices
Bi-04	CP001515.1	Human feces
KLDS2.0603	CP007522.1	Adult feces
V9	CP001892.1	Human feces
CNCMI-2494	CP002915.1	Human feces
Bi-07	CP003498.1	Human feces
B112	CP004053.1	Human colonoscopic sample
B420	CP003497.1	Human feces
AD011	CP001213.1	Infant feces
DSM10140 ^T	CP001606.1	Yoghurt

1.2.6 API 50 CHL 糖发酵实验

严格按照 API 50 CHL 试剂盒说明书进行试剂的制备。使用恒温培养箱, 条件为 37 °C、培养 48 h。分别在 24 h 和 48 h 各收集 1 次数据。

1.2.7 碳水化合物酶注释

基于 Probio-M8、V9、BB-12、Bi-07 和 HN019 全基因组序列, 通过碳水化合物活性酶数据库(CAZy)分析这 5 株乳双歧杆菌的碳水化合物活性酶功能基因。

2 结果与分析

2.1 ANI 和 TNI 分析

在比较基因组学分析过程中, ANI 可用

于评估基因组间多态性, 也可判断基因组之间的相似性, 一般认为 ANI 大于等于 95% 为同一种^[21]。ANI 结果显示, 22 株乳双歧杆菌的 ANI 值均大于 99.88%, 其中 Probio-M8 与 DSM10140^T 的 ANI 值为 99.99%。TNI 是通过计算基因组之间核酸匹配比例, 为基因组数据集提供更高的区分能力^[22] (图 1)。22 株乳双歧杆菌 TNI 值均大于 99.20%, 其中 Probio-M8 与 DSM10140^T 的 TNI 值为 99.89%。Díaz 等^[23] 研究发现, *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* 的 ANI 值大于 96.5%。因此, 相较 *Bifidobacterium longum* subsp. *longum*, 乳双歧杆菌种内的基因组相似性更高。

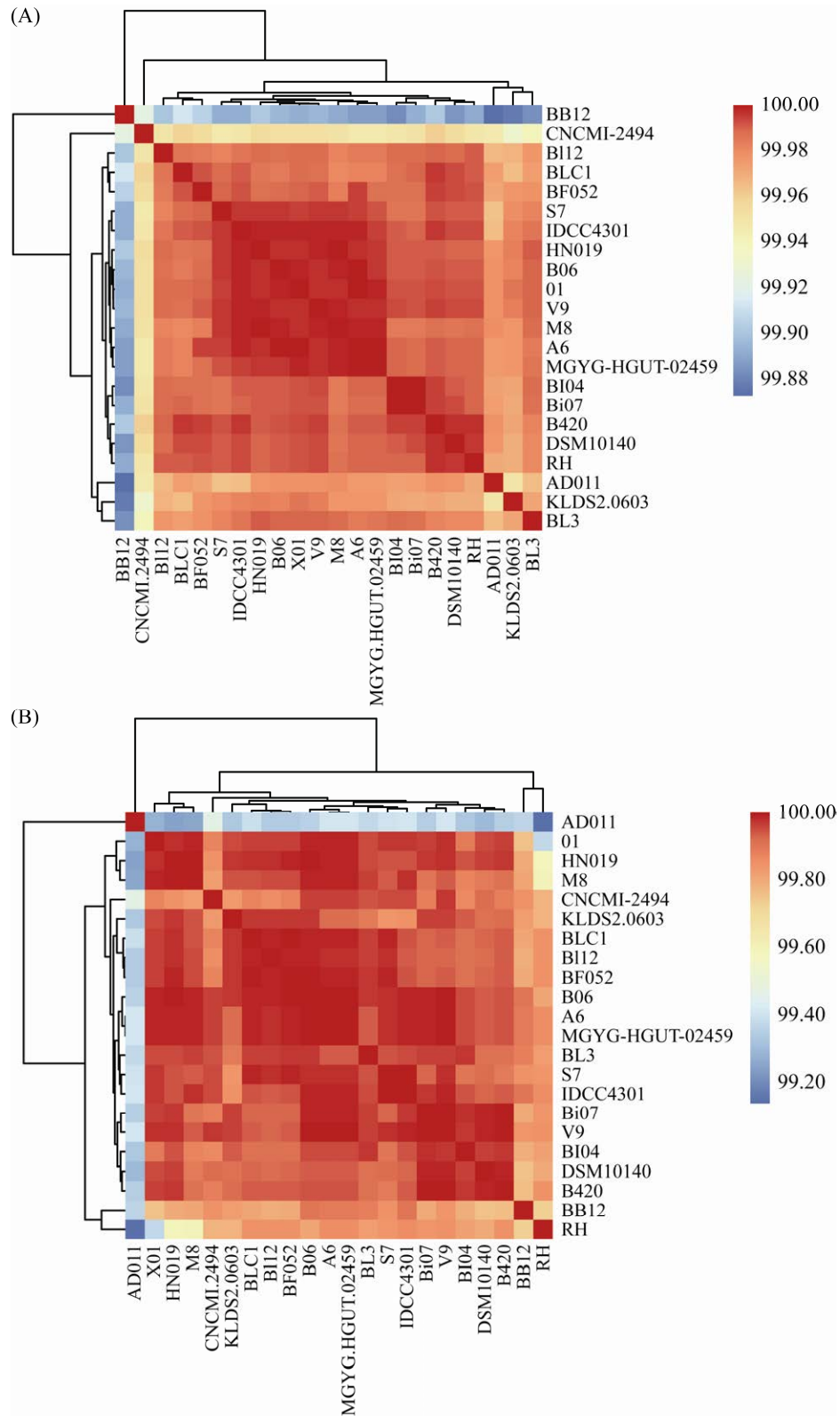


图 1 22 株乳双歧杆菌的 ANI (A)及 TNI (B)的结果

Figure 1 Results of ANI (A) and TNI (B) of 22 strains of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*.

2.2 泛-核心(pan-core)基因集构建

22株乳双歧杆菌的泛基因组包含1 618个基因,其中核心基因1 514个,特有基因16个,核心基因占泛基因集的93.57%。Da Silva等^[24]对19株*Bifidobacterium longum*全基因组的分析结果表明,该菌株的泛基因组包含5 126个基因,其中包含1 195个核心基因、1 207个独特基因,核心基因占泛基因集的23.31%,由此说明*Bifidobacterium longum*的基因多样性高。相较于*Bifidobacterium longum*,22株乳双歧杆菌的核心基因集高度保守。对于泛基因存在与缺失的结果绘制热图,由图2A可知,泛基因的存在与缺失表明22株乳双歧杆菌核心基因组高度保守。进一步对Probio-M8与V9、BB-12、Bi-07、HN019的核心基因绘制Venn图(图2B)。结果发现,Probio-M8与V9、BB-12、Bi-07、HN019相较22株乳双歧杆菌的核心基因组具有更高的保守性。

2.3 核心基因(core genome)系统发育树

系统发育树可以直观地表现出同一个群体内不同个体间的遗传距离与进化关系,遗传距离在检测进化关系方面起着很大的作用^[25],构建系统发育树是研究种群结构和物种进化的必要前提^[26]。聚集在同一分支,表明菌株之间的多样性较低,遗传距离较近。为了进一步了解22株乳双歧杆菌的遗传距离,本研究基于1 514个核心基因,通过邻接法(neighbor-joining)构建了系统发育树。由图3可知,22株乳双歧杆菌分为2个分支,AD011单独为一个分支,其他菌株在另外的分支。由核心基因(core genome)构建的系统发育树可知,22株乳双歧杆菌的遗传距离较近,并且Probio-M8与V9、BB-12、Bi-07、HN019五株益生菌菌株之间的遗传距离小于 2.97×10^{-5} ^[27],故Probio-M8与V9、BB-12、Bi-07和HN019具有高度相似的遗传特征。陈霞^[28]研究发现,AD011在进化过程中

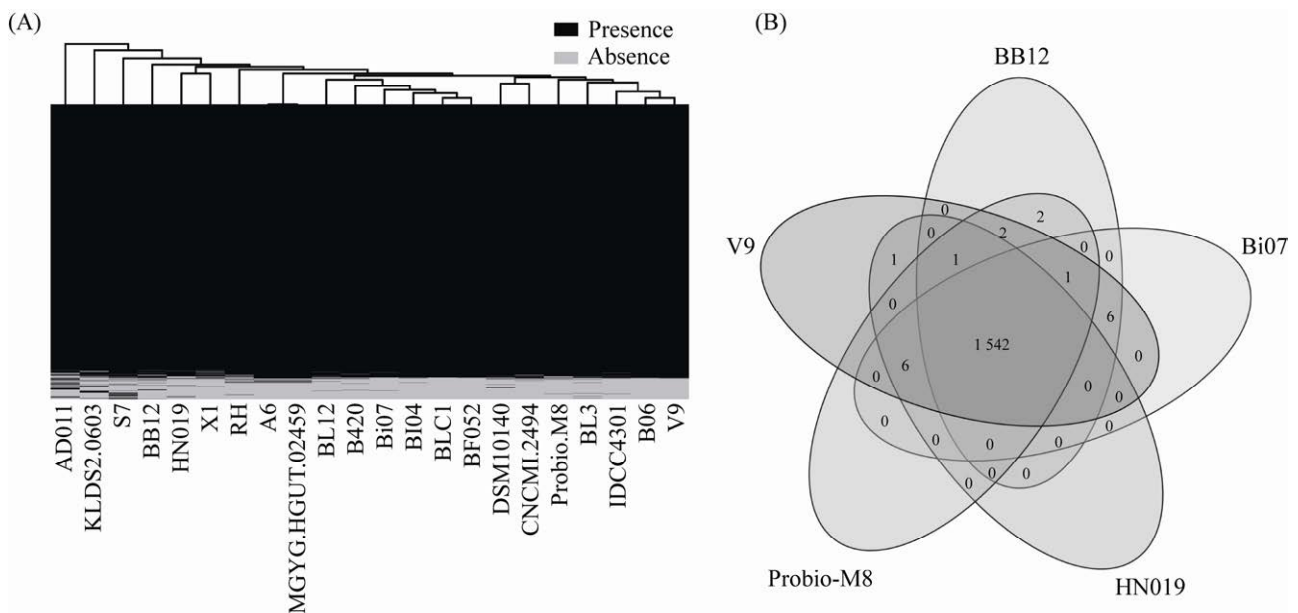


图2 22株乳双歧杆菌泛基因存在与缺失热图以及Probio-M8、V9、BB-12、Bi-07和HN019核心基因Venn图

Figure 2 Heat map of the presence and absence of pan-genes of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* and Venn map of the core genes of Probio-M8, V9, BB-12, Bi-07 and HN019. A: heat map. B: Venn map.

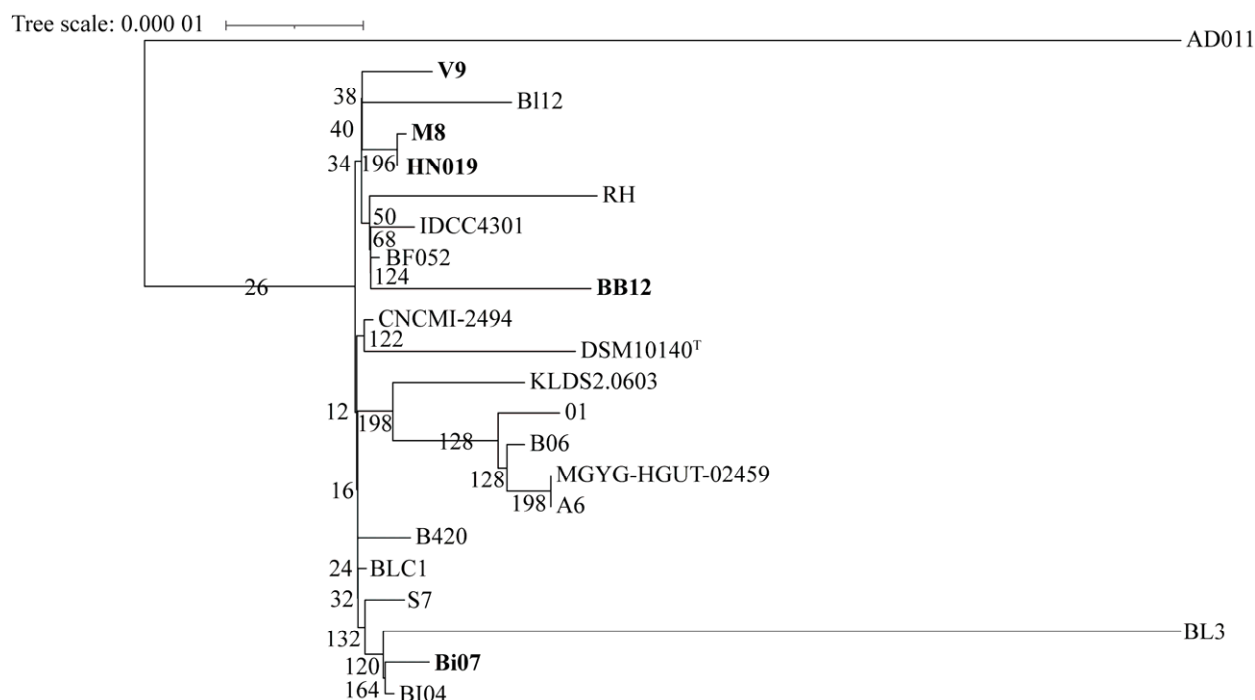


图3 基于1514个核心基因序列以邻接法构建的乳双歧杆菌菌株系统发育树

Figure 3 Phylogenetic tree of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* based on 1514 core gene sequences constructed by the neighbor-joining method.

发生了小范围的基因重组和转移现象，这可能是菌株 AD011 单独一个分支的原因。

2.4 共线性、耐药基因及毒力基因分析

共线性分析是研究物种基因组间相关性的方法，基因组相关性越高其亲缘关系越近，表明基因组序列部分或全部保守^[29]。本研究以乳双歧杆菌 BB-12 的全基因组序列作为参考，通过 Mauve 软件分析 Probio-M8 与 V9、BB-12、Bi-07、HN019 的共线性情况。结果发现，Probio-M8、V9、Bi-07 和 HN019 与 BB-12 相似度较高，基因组中未检测到基因片段的倒位，Bi07 在位置 1 309 854 有 1 个大小为 1 760 bp 的插入片段，包含 1 个基因 *yoaB*，与钙转运 ATP 酶的功能有关(图 4)。HN019 存在 1 个插入片段，包含基因 *treC*，该基因具有编码 6-磷酸海藻糖水解酶的功能。Probio-M8 存在 1 个插入，包含基因 *treC*，与 6-磷酸海藻糖水解酶的

合成有关。V9 存在 2 个插入，包含 *melD* 基因，与蜜二糖/棉子糖/水苏糖导入通透酶蛋白的合成有关。并且 HN019 在 1 860 617 bp 处存在 1 个大小为 2 299 bp 片段的缺失，包含 *sdhA* 基因，负责编码琥珀酸脱氢酶黄素蛋白亚基。V9 存在 5 个片段的缺失，包含基因 *recQ*、*nhaA*，分别负责编码 ATP 依赖性 DNA 解旋酶和 Na(+)/H(+)逆向转运蛋白，并且所有的插入片段不含特有基因。短基因片段的插入和缺失提示菌株在进化过程中可能发生了基因的重组和转移^[30]。上述结果表明，Probio-M8 与 V9、BB-12、Bi-07、HN019 基因组相似度较高。

能够在肠胃中存活是益生菌发挥益生特性的重要基础，研究表明 Probio-M8 暴露于 pH 2.5 的人工胃液 3 h 后成活率为 85.38%，暴露于 pH 8.0 的人工肠液 8 h 后成活率为 97.25%，其存活率优于对照菌株 *B. lactis* BB12；在 0.3%胆汁

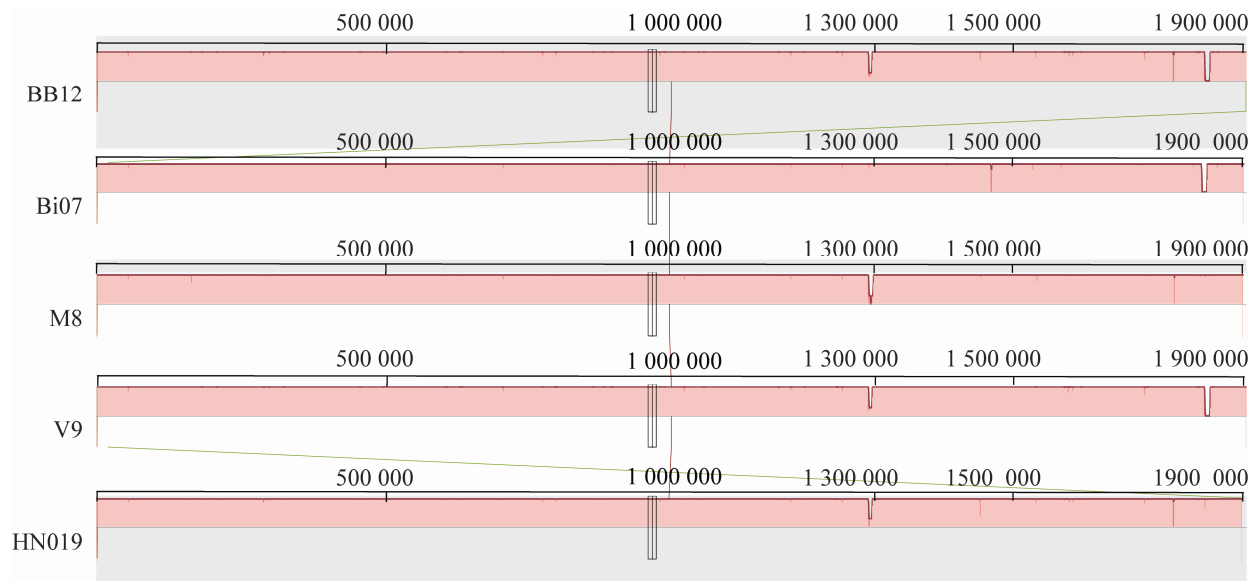


图 4 BB-12、Bi-07、HN019、Probio-M8 和 V9 共线性分析

Figure 4 Collinearity analysis of BB-12, Bi-07, HN019, Probio-M8 and V9.

盐存在下, 乳双歧杆菌 Probio-M8 比对照菌株 BB-12 表现出更高的耐受性。因此, Probio-M8 可以在肠道内存活和减少氧化应激^[13]。

将 Probio-M8 与 V9、BB-12、Bi-07、HN019 的全基因组与耐药基因数据库(CARD)和毒力基因数据库(VFDB)比对, 发现 Probio-M8 与 V9、BB-12、Bi-07、HN019 全基因组中存在 *dfmA43*、*tetW* 和 *rpoB* 三种固有的抗生素抗性基因, 且种类、拷贝数完全一致, 并且不存在毒力基因。

2.5 SNPs 结果分析

以 Probio-M8 全基因组作为参考, 对其余 4 株菌的 SNPs 进行分析。其中鉴定到 45 个 SNPs 位点, 包括 11 个同义突变位点和 20 个非同义突变位点, 其余位于基因间区。平均每株菌拥有 11 个 SNP。陈霞^[28]以 *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* AD011 全基因组序列作为参考, 发现 *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* V9、*Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bi04 和

Bifidobacterium animalis subsp. *lactis* DSM10140 共存在 276 个 SNP 位点, 包括 178 个非同义突变、60 个非编码区突变和 38 个同义突变, 平均每株菌拥有 92 个 SNP, 认为是少数突变。相比较, 乳双歧杆菌 Probio-M8 与 V9、BB-12、Bi-07、HN019 的 SNP 多态性极少, 遗传异质性较低(表 2)。

2.6 API 50 CHL 糖酵解实验结果分析

基于 API 50 CHL 试剂盒对 Probio-M8、V9、BB-12 与 HN019 进行糖发酵实验, 分别在 24 h 与 48 h 进行信息采集。结果如表 3 所示, 在 2 次信息采集点, 对 Probio-M8、V9、BB-12 及 HN019 糖代谢结果进行了统计。比较 Probio-M8、V9、BB-12 及 HN019 的糖酵解能力发现, Probio-M8 与其他 3 株菌仅对 L-阿拉伯糖(LARA)、D-木糖(DXYL)、甘露醇(MAN)、D-松三糖(MLZ)及 D-塔格糖(TAG)的代谢存在差异, 并且 Probio-M8 与 V9、BB-12 及 HN019 的糖代谢差异较小。

表 2 Probio-M8、V9、BB-12、Bi-07 和 HN019 SNPs 分析

Table 2 Analysis of Probio-M8, V9, BB-12, Bi-07 and HN019 SNPs

Position	Probio-M8	Bi-07	HN019	V9	BB-12	Probio-M8 Gene	Mut-type	Function
1026063	G	G	G	A	G	RS04460	Nonsyn	Glutamate synthase large subunit
1152980	T	T	T	G	T	RS05025	Nonsyn	WhiB family transcriptional regulator
1152982	A	A	A	G	A	RS05025	Nonsyn	WhiB family transcriptional regulator
1173718	G	G	G	T	G	RS05115	Syn	UPF0182 family protein
1197280	T	G	G	G	G	RS05220	Syn	SDR family NAD(P)-dependent oxidoreductase
1250922	T	C	T	C	C	RS05440	Nonsyn	Bifunctional (p)ppGpp synthetase/guanosine-3'-bis(diphosphate) 3'-pyrophosphohydrolase
1252724	T	C	T	C	C	RS05440	Nonsyn	Bifunctional (p)ppGpp synthetase/guanosine-3'-bis(diphosphate) 4'-pyrophosphohydrolase
1260131	C	G	C	C	C	RS05470	Nonsyn	Glucose transporter
1260499	C	C	C	T	C	–	Intergenic	
1305243	A	A	G	A	A	RS05645	Nonsyn	ISL3-like element IS2001 family transposase
1305311	G	G	G	G	A	RS05645	Nonsyn	ISL3-like element IS2002 family transposase
1312012	C	C	C	C	T	RS05665	Nonsyn	ISL3-like element IS2001 family transposase
1312436	C	T	T	T	T	RS05665	Nonsyn	ISL3-like element IS2002 family transposase
1589335	T	C	T	C	C	–	Intergenic	
1637379	G	G	G	A	G	RS06960	Nonsyn	Hypothetical protein
1639679	T	C	T	T	T	RS06970	Nonsyn	Sugar transferase
1643939	A	G	A	G	G	–	Intergenic	
1646040	C	T	C	C	C	RS07000	Syn	Pyridoxal 5'-phosphate synthase glutaminase subunitPdxT
1651944	G	G	G	A	G	RS07030	Syn	EpsG family protein
178364	T	G	T	G	G	–	Intergenic	
1861841	A	G	A	A	A	–	Intergenic	
1874774	C	G	G	G	G	–	Intergenic	
1874792	C	T	T	T	T	–	Intergenic	
1879685	T	C	T	T	T	RS07890	Syn	LacI family DNA-binding transcriptional regulator
203327	G	A	A	A	A	–	Intergenic	
281374	T	C	T	T	T	–	Intergenic	
282406	A	A	A	A	G	RS01195	Nonsyn	ISL3-like element IS2001 family transposase
315437	C	A	C	C	C	RS01320	Syn	ATP-dependent DNA helicase RecG
445589	G	G	G	T	G	–	Intergenic	
485251	T	T	T	G	T	–	Intergenic	
53155	C	G	G	G	G	RS00260	Syn	ISL3-like element IS2001 family transposase
592768	C	C	C	T	C	RS02520	Nonsyn	ATP-dependent zinc metalloprotease FtsH
612735	A	C	C	C	C	–	Intergenic	
617887	C	T	C	C	C	RS02625	Nonsyn	Glycosyl hydrolase 43 family protein

(待续)

(续表 2)

687002	G	A	G	G	G	–	Intergenic	
753993	C	T	C	C	C	RS03195	Syn	Proteasome accessory factor PafA2
775644	T	G	T	G	G	RS03305	Nonsyn	HAMP domain-containing histidine kinase
777043	A	A	A	A	C	RS03305	Nonsyn	HAMP domain-containing histidine kinase
839430	T	C	T	T	T	RS03550	Nonsyn	ECF transporter S component
858102	A	A	A	G	A	RS03630	Syn	Argininosuccinate lyase
936162	T	C	T	C	C	RS04040	Syn	UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase
937071	G	A	G	G	G	RS04040	Syn	UTP-glucose-2-phosphate uridylyltransferase
952409	C	A	C	C	C	RS04120	Nonsyn	Glycosyltransferase family 4 protein
960055	G	A	G	G	G	–	Intergenic	
993129	T	C	T	T	T	RS04325	Nonsyn	Bifunctional ADP-dependent NAD(P)H-hydratede hydratase/NAD(P)H-hydrate epimerase

Mut-type: mutation type; syn: synonymous mutation; nonsyn: non-synonymous mutation, intergenic means intergenic. –: no result.

表 3 Probio-M8、V9、BB-12 及 HN019 API 50 CHL 分析

Table 3 Analysis of Probio-M8, V9, BB-12 and HN019 API 50 CHL

Sugar	Probio-M8		V9		BB-12		HN019	
	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h
Negative control	–	–	–	–	–	–	–	–
Glycerol	–	–	–	–	–	–	–	–
Erythritol	–	–	–	–	–	–	–	–
D-arabinose	–	–	–	–	–	–	–	–
L-arabinose	–	–	–	+	+	+	+	+
D-ribose	+	+	+	+	+	+	+	+
D-xylose	–	–	+	+	+	+	+	+
L-xylose	–	–	–	–	–	–	–	–
D-ribitol	–	–	–	–	–	–	–	–
Methyl-β-D-xylopyranoside	–	–	–	–	–	–	–	–
D-galactose	+	+	+	+	+	+	+	+
D-glucose	+	+	+	+	+	+	+	+
D-gructose	+	+	+	+	+	+	+	+
D-gannose	+	+	+	+	+	+	+	+
L-sorbitose	–	–	–	–	–	–	–	–
L-rhamnose	–	–	–	–	–	–	–	–
Dulcitol	–	–	–	–	–	–	–	–
Inositol	–	–	–	–	–	–	–	–
Mannitol	–	–	+	+	+	+	+	+
Sorbitol	–	–	–	–	–	–	–	–
Methyl-α-D-mannopyranoside	–	–	–	–	–	–	–	–
Methyl-α-D-glucopyranoside	–	–	–	–	–	–	–	–

(待续)

(续表 3)

N-acetyl glucosamine	+	+	+	+	+	+	+	+
Amygdalin	+	+	+	+	+	+	+	+
Arbutin	+	+	+	+	+	+	+	+
Aesculus ferric citrate	+	+	+	+	+	+	+	+
Salicin	+	+	+	+	+	+	+	+
D-cellobiose	+	+	+	+	+	+	+	+
D-maltose	+	+	+	+	+	+	+	+
D-lactose	+	+	+	+	+	+	+	+
D-melibiose	+	+	+	+	+	+	+	+
D-sucrose	+	+	+	+	+	+	+	+
D-trehalose	+	+	+	+	+	+	+	+
Inulin	-	-	-	-	-	-	-	-
D-matsutose	-	-	-	-	-	+	-	+
D-raffinose	+	+	+	+	+	+	+	+
Modified starch	+	+	+	+	+	+	+	+
Glycogen	-	-	-	-	-	-	-	-
Xylitol	-	-	-	-	-	-	-	-
D-gentiobiose	+	+	+	+	+	+	+	+
D-toron sugar	-	+	-	+	-	+	-	+
D-lyxose	-	-	-	-	-	-	-	-
D-tagatose	-	+	-	-	-	-	-	+
D-salalose	-	-	-	-	-	-	-	-
L-salalose	-	-	-	-	-	-	-	-
D-arabinol	-	-	-	-	-	-	-	-
L-arabinol	-	-	-	-	-	-	-	-
Potassium gluconate	+	+	+	+	+	+	+	+
Potassium 2-ketogluconate	-	-	-	-	-	-	-	-
Potassium 5-ketogluconate	-	-	-	-	-	-	-	-

+: positive result; -: negative result.

2.7 碳水化合物酶注释结果分析

碳水化合物的利用是益生菌发挥益生特性的重要基础。为在全基因组水平上了解 Probio-M8 与 V9、BB-12、Bi-07、HN019 这 5 株菌对碳水化合物的代谢能力, 通过碳水化合物活性酶数据库(CAZy)分析发现, 5 株乳双歧杆菌共有 47 个 CAZy 家族, 包括 10 个糖苷水解酶家族(glycoside hydrolase, GH)、10 个糖基转移酶家

族(glycosyl transferase, GT)、12 个碳水化合物结合结构域家族(carbohydrate binding module, CBM)和 3 个碳水化合物酯酶家族(carbohydrate esterases, CE)。V9、BB-12 和 HN019 的碳水化合物代谢相关基因完全一致, Bi-07 没有 *GH49* 基因且少一个 *GHI3* 基因的拷贝, 而 Probio-M8 多一个 *GH49* 基因的拷贝。由此表明 Probio-M8 碳水化合物代谢功能基因高度保守(图 5)。

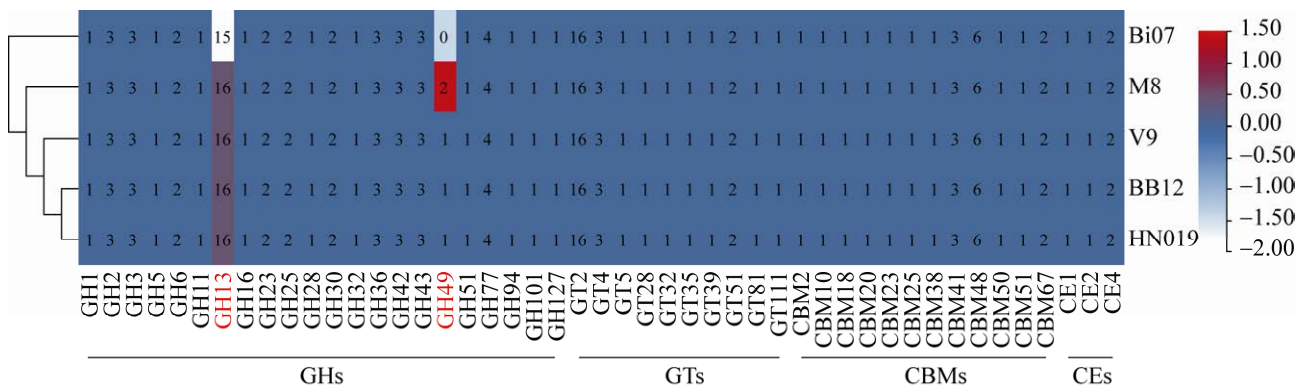


图5 基于全基因组序列的 CAZy 注释结果热图

Figure 5 Heat map of CAZy annotation results based on whole genome sequence. GHs: glycoside hydrolases; GTs: glycosyltransferases; CBMs: carbohydrate binding modules; CEs: glycoesterases.

3 结论

本研究利用 NCBI Refseq 数据库中 21 株 *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* 和 1 株模式菌株的全基因组进行比较基因组学分析, 发现乳双歧杆菌的核心基因高度保守。核心基因系统发育分析发现, 22 株乳双歧杆菌分为两个分支, Probio-M8 和其他菌株与模式菌株 DSM10140^T 聚在同一分支, 并且泛基因的存在与缺失极为相似。共线性及 SNPs 分析进一步证明 Probio-M8 与 V9、BB-12、Bi-07 和 HN019 的基因组保守。抗生素抗性基因检测发现 Probio-M8 与 V9、BB-12、Bi-07、HN019 基因组上均检测到 *dfiA43*、*tetW* 及 *rpoB* 三种拷贝数完全一致的固有耐药基因, 且均不含毒力基因, 表明 Probio-M8 的毒力和耐药相关功能基因组保守。API 50 CHL 结果表明, Probio-M8 与其他 3 株菌仅对 L-阿拉伯糖(LARA)、D-木糖(DXYL)、甘露醇(MAN)、D-松三糖(MLZ)及 D-塔格糖(TAG)的代谢存在差异, 并且 Probio-M8 与 V9、BB-12 及 HN019 的糖代谢差异较小。进一步进行碳水化合物代谢活性酶(CAZyme)注释, 结果发现, V9、BB-12 和 HN019 的碳水化合物代谢相关基因完全一

致, Bi-07 没有 *GH49* 基因且少一个 *GH13* 基因拷贝, 而 Probio-M8 多一个 *GH49* 的基因拷贝, 由此表明 Probio-M8 与 V9、BB-12、Bi-07、HN019 具有相似的碳水化合物代谢相关基因。综上所述, 本研究从全基因组水平对 22 株乳双歧杆菌的基因组分析发现, 乳双歧杆菌核心基因集高度保守, Probio-M8 与 V9、BB-12、Bi-07 和 HN019 的遗传特征高度相似、基因组差异及糖代谢能力差异较小, 为 Probio-M8 的后续研究提供数据支持。

参考文献

- [1] Masco L, Ventura M, Zink R, Huys G, Swings J. Polyphasic taxonomic analysis of *Bifidobacterium animalis* and *Bifidobacterium lactis* reveals relatedness at the sub species level: reclassification of *Bifidobacterium animalis* as *Bifidobacterium animalis* subsp. *animalis* subsp. nov. and *Bifidobacterium lactis* as *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* subsp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2004, 54(Pt 4): 1137–1143.
- [2] Mitsuoka T, Hayakawa K. The fecal flora in man. I. Composition of the fecal flora of various age groups. *Zentralbl Bakteriolog Orig A*, 1973, 238(2): 333–342.
- [3] Bode L. Human milk oligosaccharides: every baby needs a sugar mama. *Glycobiology*, 2012, 22(9): 1147–1162.

- [4] Chiu YH, Tsai JJ, Lin SL, Chotirosvakini C, Lin MY. Characterisation of bifidobacteria with immunomodulatory properties isolated from human breast milk. *Journal of Functional Foods*, 2014, 7: 700–708.
- [5] Gomez DE, Arroyo LG, Costa MC, Viel L, Weese JS. Characterization of the fecal bacterial microbiota of healthy and diarrheic dairy calves. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 2017, 31(3): 928–939.
- [6] Di Pierro F, Bertuccioli A, Saponara M, Ivaldi L. Impact of a two-bacterial-strain formula, containing *Bifidobacterium animalis* lactis BB-12 and *Enterococcus faecium* L3, administered before and after therapy for *Helicobacter pylori* eradication. *Minerva Gastroenterologica e Dietologica*, 2020, 66(2): 117–123.
- [7] Castro-Mejía JL, O’Ferrall S, Krych Ł, O’Mahony E, Namusoke H, Lanyero B, Kot W, Nabukeera-Barungi N, Michaelsen KF, Mølgaard C, Friis H, Grenov B, Nielsen DS. Restitution of gut microbiota in Ugandan children administered with probiotics (*Lactobacillus rhamnosus* GG and *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12) during treatment for severe acute malnutrition. *Gut Microbes*, 2020, 11(4): 855–867.
- [8] Turck D, Castenmiller J, De Henauw S, Hirsch-Ernst KI, Kearney J, Knutsen HK, Maciuk A, Mangelsdorf I, McArdle HJ, Naska A, Pelaez C, Pentieva K, Thies F, Toubour S, Vinceti M, S Bresson JL, Siani A. *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bi-07 contributes to increasing lactose digestion: evaluation of a health claim pursuant to Article 13(5) of regulation (EC) No_{1924/2006}. *EFSA Journal*, 2020, 18(7): 6198.
- [9] Holkem AT, Favaro-Trindade CS, Lacroix M. Study of anticancer properties of proanthocyanidin-rich cinnamon extract in combination with *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BLC1 and resistance of these free and co-encapsulated materials under *in vitro* simulated gastrointestinal conditions. *Food Research International*, 2020, 134: 109274.
- [10] Lan J, Hong H. Anti-aging effect of *Bifidobacterium*. *Chinese Journal of Microecology*, 1995: 7.
- [11] 卫生部. 关于公布可用于婴幼儿食品的菌种名单的公告. 中国食品卫生杂志, 2011, 23(6): 594.
Wei SB. Announcement on the list of strains that can be used in infant food. *Chinese Journal of Food Hygiene*, 2011, 23(6): 594. (in Chinese)
- [12] Sun ZH. Application of population genomics in the research of lactic acid bacteria. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2017, 17(8): 12–18.
- [13] Liu WJ, Chen MX, Duo LN, Wang JC, Guo S, Sun HT, Menghe B, Zhang HP. Characterization of potentially probiotic lactic acid bacteria and bifidobacteria isolated from human colostrum. *Journal of Dairy Science*, 2020, 103(5): 4013–4025.
- [14] Liu AL, Ma T, Xu N, Jin H, Zhao FY, Kwok LY, Zhang HP, Zhang SK, Sun ZH. Adjunctive probiotics alleviates asthmatic symptoms via modulating the gut microbiome and serum metabolome. *Microbiology Spectrum*, 2021, 9(2): e0085921.
- [15] Goris J, Konstantinidis KT, Klappenbach JA, Coenye T, Vandamme P, Tiedje JM. DNA-DNA hybridization values and their relationship to whole-genome sequence similarities. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2007, 57(Pt 1): 81–91.
- [16] Chen JP, Yang XW, Chen JW, Cen Z, Cui YJ. SISP: a fast species identification system for prokaryotes based on total nucleotide identity of whole genome sequences. *Infectious Diseases and Translational Medicine*, 2015.
- [17] Seemann T. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics*, 2014, 30(14): 2068–2069.
- [18] Page AJ, Cummins CA, Hunt M, Wong VK, Reuter S, Holden MTG, Fookes M, Falush D, Keane JA, Parkhill J. Roary: rapid large-scale prokaryote pan genome analysis. *Bioinformatics: Oxford, England*, 2015, 31(22): 3691–3693.
- [19] Medini D, Donati C, Tettelin H, Massignani V, Rappuoli R. The microbial pan-genome. *Current Opinion in Genetics & Development*, 2005, 15(6): 589–594.
- [20] Darling ACE, Mau B, Blattner FR, Perna NT. Mauve: multiple alignment of conserved genomic sequence with rearrangements. *Genome Research*, 2004, 14(7): 1394–1403.
- [21] 宋宇琴. 德氏乳杆菌保加利亚亚种的群体遗传学和功能基因组学研究. 内蒙古农业大学博士学位论文, 2018.
- [22] Sun Z, Harris HMB, McCann A, Guo C, Argimón S, Zhang W, Yang X, Jeffery IB, Cooney JC, Kagawa TF, Liu W, Song Y, Salvetti E, Wrobel A, Rasinkangas P, Parkhill J, Rea MC, O’Sullivan O, Ritari J, Douillard FP, Paul Ross R, Yang R, Briner AE, Felis GE, De Vos WM, Barrangou R, Klaenhammer TR, Caufield PW, Cui Y, Zhang H, O’Toole PW. Expanding the biotechnology potential of *Lactobacilli* through comparative genomics of 213 strains and associated genera. *Nature Communications*, 2015, 6: 8322.

- [23] Díaz R, Torres-Miranda A, Orellana G, Garrido D. Comparative genomic analysis of novel *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* strains reveals functional divergence in the human gut microbiota. *Microorganisms*, 2021, 9(9): 1906.
- [24] Da Silva JGV, Vieira AT, Sousa TJ, Viana MVC, Parise D, Sampaio B, Da Silva AL, De Jesus LCL, De Carvalho PKRML, De Castro Oliveira L, Aburjaile FF, Martins FS, Nicoli JR, Ghosh P, Brenig B, Azevedo V, Gomide ACP. Comparative genomics and *in silico* gene evaluation involved in the probiotic potential of *Bifidobacterium longum* 51A. *Gene*, 2021, 795: 145781.
- [25] Brown CJ, Mtui D, Oswald BP, Van Leuven JT, Vallender EJ, Schultz-Darken N, Ross CN, Tardif SD, Austad SN, Forney LJ. Comparative genomics of *Bifidobacterium* species isolated from marmosets and humans. *American Journal of Primatology*, 2019, 81(10/11): e983.
- [26] 刘文君, 吕瑞瑞, 李伟程, 孙志宏, 陈永福, 张和平. 基于比较基因组学揭示不同植物乳杆菌的遗传特征及菌株差异——以 *Lactobacillus plantarum* P9 和 Lp-6 研究为例. *微生物学报*, 2021, 61(8): 2370–2381.
Liu WJ, Lv RR, Li WC, Sun ZH, Chen YF, Zhang HP. Comparative genomics revealed genetic characteristics of different *Lactobacillus plantarum* strains: using P9 and Lp-6 strains as examples. *Acta Microbiologica Sinica*, 2021, 61(8): 2370–2381. (in Chinese)
- [27] 黄龙花, 谭武平, 刘远超, 黄志勇, 钟元茂, 史钊, 胡惠萍. 野生金针菇的分子鉴定及遗传多样性分析. *中国食用菌*, 2018, 37(4): 52–56.
Huang LH, Tan WP, Liu YC, Huang ZY, Zhong YM, Shi C, Hu HP. Molecular identification and genetic diversity analysis of wild *Flammulina* sp. *Edible Fungi of China*, 2018, 37(4): 52–56. (in Chinese)
- [28] 陈霞. 具有益生功能的 *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* V9 的安全性评估、生理功效及其全基因组学研究. 内蒙古农业大学博士学位论文, 2010.
- [29] 宋雪梅, 李宏滨, 杜立新. 比较基因组学及其应用. *生命的化学*, 2006, 26(5): 425–427.
Song XM, Li HB, Du LX. Comparative genomics and application. *Chemistry of Life*, 2006, 26(5): 425–427. (in Chinese)
- [30] Li WX, Yang L, Nan WL, Lu J, Zhang SW, Ujiroghene OJ, Pang XY, Lv JP. Whole-genome sequencing and genomic-based acid tolerance mechanisms of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* LJJ.. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2020, 104(17): 7631–7642.

(本文责编 李磊)