

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
49(11): 1540 - 1547; 4 November 2009
ISSN - ; CN 11 - 1995/Q
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

藏北地区传统发酵乳中乳杆菌的多样性分析

剧柠, 张家超, 孙志宏, 刘文俊, 靳焯, 张和平, 孙天松*

(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】针对藏北地区的乳杆菌来源及种属, 对其多态性进行研究。【方法】采用 ERIC-PCR 技术和 NTSYS-pc2.1 软件对从藏北地区牧民家庭制作的发酵乳制品中分离出的 77 株乳杆菌进行多样性分析。【结果】ERIC-PCR 扩增出的条带清晰, 重复性好, 多态性高。聚类分析表明, 在 0.73 的水平上, 77 株乳杆菌共分为 4 大类群: 干酪乳杆菌群 A1、发酵乳杆菌群 A2, 瑞士乳杆菌群 A3 和植物乳杆菌群 A4。其中, 干酪乳杆菌群 A1 和发酵乳杆菌群 A2 分别占供试乳杆菌的 35.06% 和 61.04%, 为优势菌群。进一步对优势菌群聚类, 在 0.80 的水平上, 群 A1 被分成 5 个基因型, 在 0.84 的水平上, 群 A2 被分成 6 个基因型。【结论】从分型结果来看, ERIC-PCR 技术可以将不同种属间的乳杆菌区分开, 但无法将藏北地区的乳杆菌按地理来源不同或和分离基物不同区分开。

关键词: 西藏; 传统发酵乳制品; 乳杆菌; 多样性; ERIC-PCR

中图分类号: Q939 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2009) 11-1540-08

乳杆菌属 (*Lactobacillus*) 归属于硬门菌门 (*Firmicutes*) 杆菌纲 (*Bacilli*) 乳杆菌目 (*Lactobacillales*) 乳杆菌科 (*Lactobacillaceae*)。乳杆菌细胞呈杆状, 通常形成短链。革兰氏阳性, 无芽孢, 无运动性。兼性厌氧, 有时微耗氧。发酵分解糖代谢, 终产物 50% 以上为乳酸。不还原硝酸盐, 不液化明胶, 触酶阴性。DNA 的 (G + C) 含量为 32% ~ 53%^[1]。1986 年版的 Bergey 氏细菌鉴定手册中记载的乳杆菌属细菌共有 44 种, 7 个亚种。2007 年已发展为 159 个种和 27 个亚种^[2]。传统上对乳杆菌的鉴定分类和分型是利用形态学和生理学特征及其差异来进行的, 难保证分类的准确性和科学性。随着分子生物学的快速发展, 基于 DNA 的标记技术 (RAPD, RFLP, PFGE, DGGE 和 AFLP 等) 为乳酸菌的快速分子鉴定和分型提供了借鉴。ERIC (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus) 为肠细菌基因间共有重复序列, 长约 126 bp, 其中心是保守

性很高的 44bp 核心序列^[3]。ERIC-PCR 技术用于基因分型, 其原理是根据 ERIC 的核心序列设计反向引物 (ERIC1/ERIC2), 经 PCR 扩增, 然后在凝胶电泳上形成一系列的谱带, 以此作为不同细菌的 DNA 标记, 得到不同的图谱, 来区分检测不同的细菌。它在细菌菌株分类鉴定中具有重要作用^[4]。

我国少数民族很久以来就有着制作和食用发酵乳制品的历史。然而, 随着我国经济和工业的发展, 传统发酵乳制品制作越来越少, 蕴藏在其中珍贵的乳酸菌资源逐渐减少。对这一资源的深入研究和认识, 对我国乳酸菌资源的开发和利用具有重要意义。本研究对从藏北地区传统发酵乳制品中分离出的, 全部经过传统生理生化实验鉴定到种的 77 株乳杆菌, 采用 ERIC 分子标记技术对其进行研究, 用以分析高原独特的自然发酵乳中乳杆菌的多样性。同时为乳杆菌菌种多样性及菌种的鉴定提供一种简便、快速的途径。

基金项目: 国家“863 计划”(2006AA10Z345, 2007AA10Z353); 国家自然科学基金(30660135, 30800861); 现代农业产业技术体系项目

* 通信作者。Tel: +86-471-4308629; Fax: +86-471-4307205; E-mail: sts9940@sina.com

作者简介: 剧柠 (1979 -), 女, 内蒙古丰镇人, 博士研究生, 研究方向为乳品微生物及分子生物学。E-mail: jn2005282@sina.com

收稿日期: 2009-06-28; 修回日期: 2009-08-02

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 样品来源: 25 份发酵乳样品采自西藏当雄县

和那曲县的采用传统工艺酿造乳制品的藏族家庭。

1.1.2 菌株来源: 试验所用菌株为样品中分离出的 77 株乳杆菌, 所有菌株都经过生理生化试验和糖发酵试验确定了其归属。菌株来源及名称见表 1。

表 1 试验用乳杆菌编号及具体来源表

Table 1 *Lactobacilli* used in this study

Strains							Collection place	isolated matrix
IMAU60066	IMAU60068	IMAU60070	IMAU60071	IMAU60072	IMAU60073	IMAU60074	Nakqu (那曲县)	Sour kurut
IMAU60075	IMAU60077	IMAU60078	IMAU60079	IMAU60080				
IMAU60082	IMAU60083	IMAU60085	IMAU60086	IMAU60087	IMAU60088	IMAU60089	Nakqu (那曲县)	Sour goat milk and Sour kurut
IMAU60090	IMAU60092	IMAU60093	IMAU60094	IMAU60095	IMAU60101	IMAU60102		
IMAU60097	IMAU60098	IMAU60099	IMAU60103	IMAU60104	IMAU60105	IMAU60107	Nakqu (那曲县)	Qula
IMAU60108	IMAU60109	IMAU60110	IMAU60111	IMAU60112	IMAU60113	IMAU60114		
IMAU60115	IMAU60116	IMAU60117	IMAU60119	IMAU60120	IMAU60121	IMAU60123		
IMAU60124								
IMAU60126	IMAU60127	IMAU60128	IMAU60140	IMAU60142	IMAU60143	IMAU60144	Dangxiong (当雄县)	Qula
IMAU60145	IMAU60146	IMAU60147	IMAU60149	IMAU60151	IMAU60152	IMAU60153		
IMAU60154	IMAU60155	IMAU60156	IMAU60157	IMAU60160	IMAU60161	IMAU60163		
IMAU60164	IMAU60165	IMAU60162	IMAU60166	IMAU60167	IMAU60168			
IMAU60136	IMAU60171						Dangxiong (当雄县)	Sour camel milk

试验用参考菌株 *Lactobacillus casei subsp. casei* ATCC393^T, *Lactobacillus casei* ATCC334^T, *Lactobacillus zeae* ATCC15820^T, *Lactobacillus fermentum* ATCC14931^T, *Lactobacillus helveticus* ATCC15009^T, *Lactobacillus plantarum* ATCC 14917^T, *Lactobacillus kefirgranum* CCM7068^T 均购自美国菌种保藏中心, 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保藏并提供。

将所有乳杆菌以 1% 的接种量接种在液体 MRS 培养基中, 37℃ 下培养 18 - 20 h, 按此方法活化 2 代后备用。

1.1.3 仪器和试剂: MJ PTC 200 梯度基因扩增仪, UVP CDS8000 凝胶成像分析系统, 高速冷冻离心机, PCR 扩增仪, 电泳仪, 水平电泳槽。

缓冲液与常备试剂参照文献^[5]制备。rTaq 酶、dNTP、DNA Marker 等试验用试剂均购自大连宝生物工程有限公司。

1.2 基因组 DNA 的提取及检测

采用 CTAB 法提取菌株基因组 DNA。在收集好的乳酸菌菌体中加入 567 μL 的 TE 缓冲液, 用吸管反复吹打, 使之重悬。然后加入 30 μL 10% SDS (W/V) 和 3 μL 20 mg/mL 蛋白酶 K, 混匀, 于 37℃ 水浴保温 1 h。再加入 100 μL 10 mol/L CTAB 溶液 (4.1 g NaCl 溶于 80 mL 水中缓慢加入 CTAB 10 g) 及 100 μL 浓度为 0.7 mol/L NaCl 溶液, 混匀, 65℃ 水浴保温 10 min, 得到粗提取液。在此粗提取液中加入

700 μL 的酚/氯仿/异戊醇 (25:24:1, V/V, 颠倒混匀, 10000 × g 离心 5 min; 取上清, 并加入 700 μL 氯仿/异戊醇 (24:1, V/V), 颠倒混匀, 10000 × g 离心 5 min, 弃下层。在所得到的上清中, 加 0.1 倍体积 3 mol/L NaAC, 轻轻混匀; 再加入 1 倍体积冰异丙醇, 颠倒混合, 室温下静止 10 min, 沉淀 DNA, 10000 × g 离心 5 min, 弃去上清, 得到 DNA 沉淀。加 1 mL 70% 酒精, 悬浮、洗涤 DNA 沉淀, 离心 5 min, 清除酒精, 吸干 DNA, 加 100 μL TE 缓冲液充分溶解 DNA (55℃, 保温 20 min, 助溶)。待 DNA 充分溶解后, 加入 5 μL 4 mg/mL RNase 37℃, 保温 30 min。加入 400 μL TE 缓冲液, 加入 500 μL 酚/氯仿/异戊醇混合液 (25:24:1), 混匀, 重复上述抽提、沉淀、洗涤等步骤, 最后用 3060 μL 灭菌去离子水溶解 DNA, 置于 -20℃ 保存。

取 2 μL 纯化的 DNA 溶液, 在微量紫外分光光度计上读取 260 nm 和 280 nm 的 OD 值, 以确定 DNA 纯度和浓度。在 0.5 × TBE 缓冲下, 取 5 μL DNA 样品在 0.8% 琼脂糖凝胶上电泳 (电压 4 V/cm, 终浓度为 1 mg/mL 的溴化乙锭染色), 然后在 UVP 凝胶分析系统中观察 DNA 有无降解并照相。提取的每份 DNA 纯品经调整浓度为 100 ng/μL 后用于 PCR 扩增。

1.3 ERIC-PCR 扩增反应条件及反应体系

扩增引物 ERIC1: 5'-ATGTAAGCTCCTGGGGA TTCAC-3', ERICII: 5'-AAGTAAGTGACTG GGGTCA GCG-3' 由大连宝生物工程有限公司合成。PCR 反应

条件为:预变性 94℃, 7 min; 变性 94℃, 1 min; 复性 48℃, 1 min; 延伸 72℃, 5 min; 30 个循环; 最后 72℃, 末端延伸 7 min。

采用优化后的体系进行反应。25 μL 扩增体系中含有: 10 \times PCR Buffer 2.5 μL , dNTPs(0.25 mmol/L) 2.0 μL , rTaq 酶(5 U/ μL) 0.2 μL , 引物(100 pmol/L) 0.25 μL , DNA 模板(100 ng/ μL) 1.0 μL (对照不加 DNA 模板, 用相同体积的双蒸水代替), MgCl_2 (2.5 mmol/L) 2.0 μL , 加双蒸水补充至 25 μL 。

1.4 扩增产物检测

PCR 反应结束后, 取 2 μL 反应产物和 2 μL 6 \times Loading Buffer 混匀, 点样于 1.5% 的琼脂糖凝胶中进行电泳。电泳结束后, 置凝胶成像仪下观察结果。扩增效果好的用于多态电泳。

1.5 PCR 扩增稳定性试验

选取几株不同的标准菌为对象, 在相同的条件下每个菌株做 3 个重复, 并在 1.8% 的琼脂糖上检测 ERIC-PCR 的重复性。

1.6 ERIC-PCR 多态电泳

将 ERIC-PCR 扩增产物以 5:1 的比例与 6 \times Loading Buffer 混合, 在 1.8% 的琼脂糖上点样, 上样

量为 15 μL 。电压为 4 V/cm, 4℃ 下电泳 8 h。经 EB 染色, 在紫外灯下拍照并保存。

1.7 数据分析

根据扩增带的强弱、可重复性及分离清晰度, 淘汰假像带后, 每条多态 DNA 片段视为一个分子标记, 对于每个分子标记不同样品间进行比较, 在同一位点的 ERIC 条带存在时赋值为 1, 不存在时记为 0。采用 NTSYSpc 2.1 软件, 以简单匹配系数(SM)为基础, 采用算术平均非加权对群法(UPGMA)进行聚类分析, 并绘出聚类树状图。

2 结果和分析

2.1 乳杆菌 DNA 提取及检测

采用改良的 CTAB 法提取乳杆菌基因组 DNA。提取的 DNA 溶液无色透明, 经微量紫外分光光度计测定, A_{260}/A_{280} 的比值均在 1.8 ~ 2.0 范围内, DNA 纯度较高。以 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 提取结果, 图 1 是其中 20 株乳杆菌的 DNA 电泳结果, 可以看出在 23 Kb 附近有清晰可见的条带, 无弥散(smear)现象, 采用该方法可以满足实验所需模板的要求。

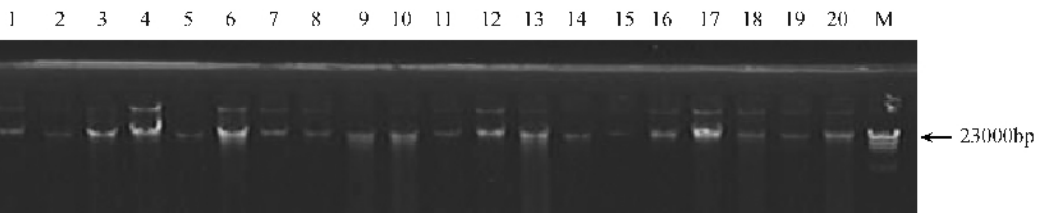


图 1 部分乳酸菌基因组 DNA 琼脂糖凝胶电泳检测

Fig. 1 Electrophoresis pattern derived from DNA of *Lactobacilli*. 1 - 20: The DNA from part of *Lactobacilli*; M: λ DNA/*Hind* III.

2.2 供试菌株的 ERIC-PCR 分析

采用 5 株参考菌株, 每株 3 个平行, 进行重复性试验。五株菌的重现率从 87.72% ~ 100% 不等。本试验重现率较高, 说明采用的条件是合适的, 取得的结果比较准确、可靠, 完全可以满足聚类分析的使用。

在本研究中, 由于乳杆菌 ERIC-PCR 标记的多态带分布比较大, 从 250 ~ 2000 bp 都存在多态位点, 因此选用 200 mm \times 300 mm 的大胶板, 经 1.8% 琼脂糖凝胶电泳, 进行长时低温电泳。图 2 为部分供试乳杆菌菌株的 ERIC-PCR 电泳图谱。77 株供试菌株总共扩增出 50 种, 894 条 DNA 条带, 平均每株菌扩增出 17.88 条带, 表现出较好的 DNA 多态性, DNA 条带清晰, 弱带少。菌 IMAU60095 扩增条带最多,

为 21 条, 菌 IMAU60116 扩增条带最少, 仅有 7 条。从电泳图中可知, 干酪乳杆菌在 1000 bp 上有 1 条(箭头 A), 800 bp 左右有 2 条(箭头 B)共有明显的多态带, 发酵乳杆菌在 550 bp 上有 1 条(箭头 C)特征带。瑞士乳杆菌和植物乳杆菌因样本数较少, 其特征带无法确定。

2.3 供试菌株扩增结果的聚类分析

使用 NTSYS-pc2.1 软件绘制出供试菌株的聚类图, 由图 3 可知, 以 0.73 作为分界点, 83 株乳杆菌可分为 4 个类群: A1 - A4。群 A1 包括参考菌株 *Lactobacillus casei* ATCC334^T, *Lactobacillus casei* subsp. *casei* ATCC393^T 和 *Lactobacillus zaei* ATCC15820^T。在 A1 群中共含有供试菌株 27 株, 占所有供试菌株的 35.06%, 为优势菌群之一。群 A2

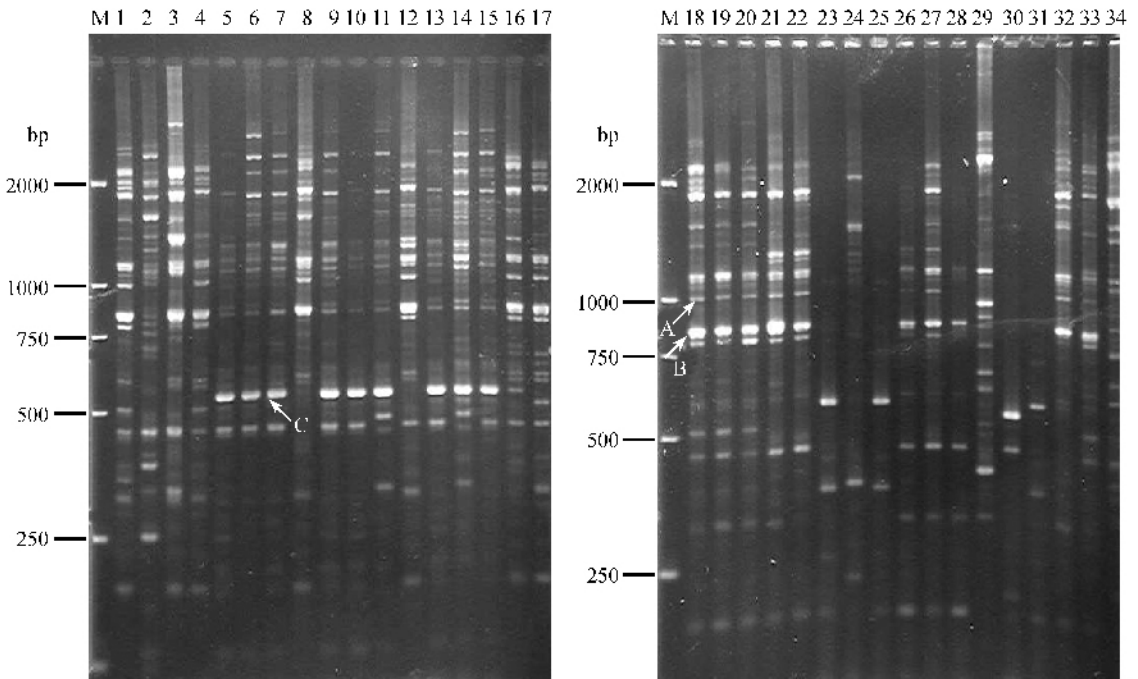


图 2 部分乳杆菌的 ERIC-PCR 电泳图

Fig.2 ERIC-PCR fingerprints of genomic DNAs of *Lactobacillus* strains. 1. IMAU60124; 2. IMAU60126; 3. IMAU60128; 4. IMAU60136; 5. IMAU60137; 6. IMAU60140; 7. IMAU60142; 8. IMAU60143; 9. IMAU60144; 10. IMAU60145; 11. IMAU60149; 12. IMAU60153; 13. IMAU60155; 14. IMAU60156; 15. IMAU60166; 16. IMAU60160; 17. IMAU60165; 18. IMAU60074; 19. IMAU60095; 20. IMAU60097; 21. IMAU60109; 22. IMAU60103; 23. IMAU60116; 24. IMAU60123; 25. IMAU60068; 26. IMAU60066; 27. IMAU60068; 28. IMAU60095; 29. IMAU60096; 30. IMAU60099; 31. IMAU60115; 32. IMAU60117; 33. IMAU60134; 34. IMAU60143; M. DL2000.

是最大的一类，参考菌 *Lactobacillus fermentum* ATCC14931^T 在该群中。A2 群中含有供试菌株 47 株，占有供试菌株的 61.04%，为另一个优势菌群。群 A3 包括菌：IMAU60068，IMAU60116 和 *Lactobacillus helveticus* ATCC15009^T。群 A4 最小，只含有菌 IMAU60171 和参考菌株 *Lactobacillus plantarum* ATCC 14917^T。聚类结果和传统鉴定结果十分吻合，说明 ERIC-PCR 技术可以比较准确的反映出各菌株的亲缘关系。在这些供试菌株中，菌 IMAU60095 和 IMAU60103；IMAU60085 和 IMAU60152；IMAU60071 和 IMAU60154；IMAU60147 和 IMAU60162，它们两两间的指纹图谱一样，相似系数为 100%。

在采自西藏那曲县的 48 株乳杆菌中，与发酵乳杆菌归为一个群的有 29 株，占 60.42%，与干酪乳杆菌归为一个群的有 17 株，占 35.42%。剩下的两株菌(IMAU60068 和 IMAU60116)与瑞士乳杆菌归为一个群。在采自西藏当雄县的 30 株乳杆菌中，与发酵乳杆菌归为一类的有 18 株，占 60.00%，与干酪乳杆菌归为一类的有 11 株，占 36.67%。菌 IMAU60171 与 *Lactobacillus plantarum* ATCC 14917^T 相似性更高，被归为一个群。可见，发酵乳杆菌和干酪乳杆菌是

这两个地区发酵乳制品中的优势菌群。从不同分离基物(酸耗牛乳,羊乳 + 牦牛乳,奶渣,酸驼乳)中分离出的乳杆菌随机的归在这 4 个群中,无法按照分离基物的不同而分开。

值得注意的是在所有菌中，有两株菌(菌 IMAU60066 和 IMAU60117)和传统鉴定结果不同。菌 IMAU60066 和 IMAU60117 在传统鉴定结果中被鉴定为瑞士乳杆菌，在本实验中其图谱与 *L. casei* ATCC334^T 更加接近，被归在群 A1 中。这一结果提示需对 IMAU60066 和 IMAU60117 的分类关系作进一步探讨。除此之外，所有菌株的分类结果与传统鉴定结果相吻合。

2.4 ERIC-PCR 标记的种内分型

对优势菌群 A1 和 A2，即干酪乳杆菌群和发酵乳杆菌群进行种内分析。

从群 A1，即干酪乳杆菌群的聚类结果(图 3)中还可以看到，参考菌株 *L. casei subsp. casei* ATCC393^T 和 *L. zeae* ATCC15820^T 聚类在一起，和 *L. casei* ATCC334^T 分在不同的基因型中。近几年，国际上对 *L. casei* ATCC334^T，*L. casei subsp. casei* ATCC393^T 和 *L. zeae* ATCC15820^T 做为干酪乳杆菌的

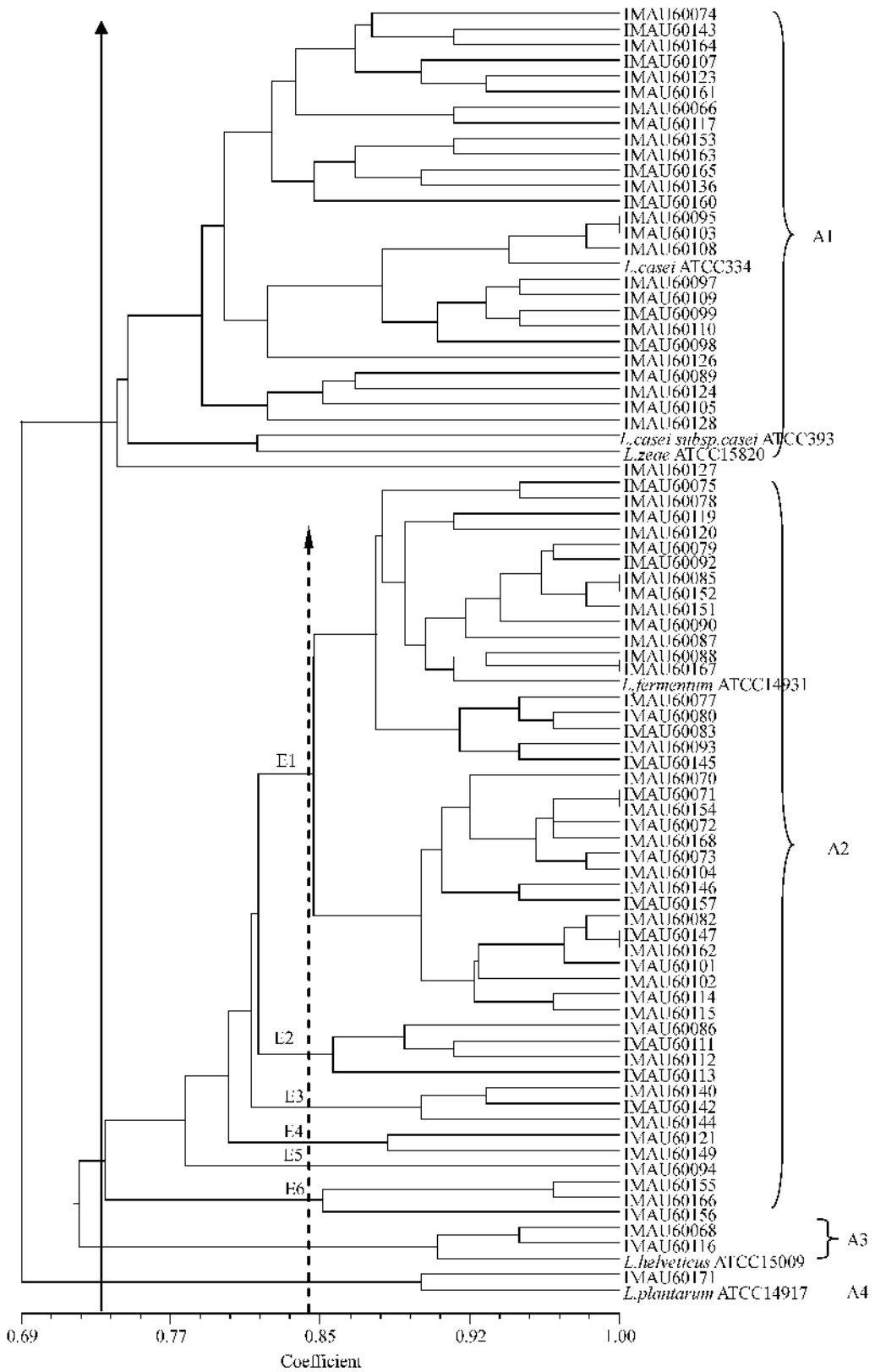


图3 西藏牦牛乳发酵乳制品 ERIC-PCR 聚类图

Fig.3 UPGMA dendrogram derived from the ERIC-PCR pattern.

标准菌株的争议时有发生。Smita Singh 等^[6]认为 *L. casei* subsp. *casei* ATCC393^T 应该属于 *L. zae*。Chun Sun Ryu 等^[7]采用基于 *EcoR* I 的核糖分型的方法, 将 *L. casei* ATCC334^T 和其它 *L. paracasei* 归为一个核糖型, 和 *L. zae* ATCC15820 聚类较远。在本试验中, *L. casei* ATCC334^T 和 *L. zae* ATCC15820^T 的相似性小于 *L. zae* ATCC15820^T 和 *L. casei* subsp. *casei* ATCC393^T 的相似性。这从另一个侧面也证明了上述说法。以 0.80 为分界点, 被分成 5 个基因型的 27 株供试乳杆菌在不同的相似性水平上和 *L. casei* ATCC334^T 聚类在了一起。它们和 *L. casei* ATCC334^T 的相似性系数从 81.8% ~ 98.4% 不等。在这 27 株菌中有 16 株来自那曲县, 11 株来自当雄县。除两株菌 IMAU60066 和 IMAU60117 在先前的传统鉴定中鉴定为发酵乳杆菌外, 其余的都鉴定为干酪乳杆菌。虽然有部分菌可以按照其来源归为一个基因型, 如菌 IMAU60127 和菌 IMAU60128, 但从整体分型的结果来看不同来源地, 不同分离基物的乳杆菌分别被聚类在不同的基因型中。菌株聚类与菌株采集地和分离基物无相互联系, 无法按照来源的不同将来自藏北地区的干酪乳杆菌进行分型。

群 A2, 即发酵乳杆菌群共含有 47 株供试菌株, 其中 30 株来自西藏那曲县, 17 株来自西藏当雄县。这 47 株供试菌株在先前的传统鉴定中均鉴定为发酵乳杆菌。供试乳杆菌在 73.0% ~ 98.4% 的相似性水平上和 *Lactobacillus fermentum* ATCC14931^T 聚在一起。以 0.84 为分界点, 47 株乳杆菌被分成 6 个基因型, E1 ~ E6(图 3)。其中 E3 和 E6 全部由来自当雄县的乳杆菌组成; E2 中的菌全部为来自那曲县的乳杆菌。构成这 3 个基因型的乳杆菌都是分离自奶渣中乳杆菌。虽然这 3 个基因型可以按照菌株的来源分型, 但仅占这个群中乳杆菌的 23.40%。最大的基因型 E1 包括来源自不同地区, 不同分离基物的乳杆菌。因此从整体上看, 无法将来源于藏北地区的发酵乳杆菌按照来源或分离基物的不同而分开。

3 结论和讨论

3.1 基因组 DNA 的提取

对于 ERIC-PCR 而言, 模板 DNA 的制备是非常重要的一个基础环节, 它的好坏直接关系着试验的成败。DNA 中含蛋白质、多糖、多酚、色素等会直接影响 DNA 聚合酶的活性, 导致 DNA 的不可溶解, 有时甚至会抑制 PCR 扩增反应的进行, 从而影响试验结果^[8]。

采用改良的 CTAB 法提取乳杆菌基因组 DNA, 在高离子强度的溶液中, CTAB 与蛋白质以及大多数酸性多聚糖形成复合物, 而不能沉淀核酸^[9]。因此, 提取过程中, 我们加入 0.7 mol/L NaCl 和 CTAB 来沉淀多糖, 制备纯化的 DNA。采用这种方法提取的 DNA 虽然损失较大, 浓度较低, 但纯度较高, 完整性好, 可以满足下一步的 PCR 实验对所需模板的要求。

3.2 ERIC-PCR 试验的重复性

与其它分子标记相比, ERIC-PCR 方法是一种快速, 经济的分子分型方法, 关于 ERIC-PCR 标记实验的重复性的探讨也很多^[10-12]。Angela^[13]等在鉴定 *Drechslera avenae* 和 *Stemphylium solani* 时发现, ERIC-PCR 扩增只能出现相似的多态性图谱; Johnson 等^[14]对同一菌株做重复性试验, 并不完全相同, 相似性大于 90%, 较 BOX 标记重复性高。Kam 等^[15]在分离 *Escherichia coli* 时也指出同样情况。这说明该技术允许有一定的误差, 只要结果在一定的误差范围之内, 就可认为有重复性或者重复性较好。本研究的重复性虽未达到 100%, 但可以满足试验要求。

3.3 关于 ERIC-PCR 的多样性

ERIC-PCR 技术近几年在对微生物群落结构的分析和动物肠道菌群的检测方面应用已十分广泛, 这些研究都表明该技术是一种重复性好、准确性和多态性较高的分子标记技术。然而国内却罕有关于 ERIC-PCR 技术用于乳杆菌多样性分析时多态性及准确性的情况的报道。本试验对 77 株乳杆菌进行分析, 总共扩增出 50 种, 894 条 DNA 条带, 多态性较好。同时, 在对 77 株乳杆菌的聚类过程中发现除 2 株乳杆菌的 ERIC-PCR 聚类结果和传统生理生化鉴定结果不同外, 其余 75 株乳杆菌的聚类结果均和传统鉴定结果吻合, 说明该方法用于乳杆菌鉴定的准确性也较高。

Ahmed^[16]对相距 30 km 左右的 2 个流域的水污染情况采用 ERIC-PCR 技术进行研究, 发现来源于人和动物的大肠杆菌和肠球菌的代谢指纹在各自地理位置上相对稳定。然而, Elizabeth^[17]对同样相距约 30 km 左右的另两个流域中的大肠杆菌采用 PFGE 和 ERIC-PCR 指纹图谱进行分析, 却发现无法将大肠杆菌按其地理位置得以区分。Casarez^[18]等采用 PFGE 和 ERIC-PCR 标记的方法, 对上述两个地区的生活污水和动物粪样分析, 虽然肠杆菌的多样性很高, 但却不能将其按地理位置区分开来。这些例证说明菌株在一个地区的地理稳定性是有限的。通

过地理范围来确定菌株还需要得到进一步的确定。本实验所使用的乳杆菌来自当雄和那曲两个县,实验结果无法将其按照地区不同区分开来。这可能是由于两个县都属于藏北地区,相距较近,两地的地理环境相似的原因。

Ventura 等^[19]对来自人体粪便、干酪、鼠粪便、酸乳、人血和株粪便中的共 16 株乳杆菌使用 ERIC-PCR 的方法进行分型,结果可按照不同的分离基物将所有菌株分开。Sahilah 等^[20]对来自家禽、蔬菜和水中的 27 株 *Salmonella* 采用 ERIC-PCR 进行分型,结果无法将菌株因其分离基物的不同而分开。Kam 等^[15]使用 ERIC-PCR 标记对分离自不同宿主的 62 株大肠杆菌进行分析,发现 ERIC-PCR 无法完全将来自人和动物的大肠杆菌按宿主不同区分开来。在本研究中使用的乳杆菌来自不同的乳制品,聚类分析无法完全将其按照分离基物的不同区分开来。这可能是因为这些菌株都来源于发酵的乳制品,相互间成份相近的原因。

参考文献

- [1] 何亮,熊礼宽,曾忠铭. 乳杆菌的分类与分子鉴定方法研究进展. 中国微生态学杂志(*Chinese Journal of Microecology*), 2007, 19(3):312 – 313.
- [2] <http://www.bacterio.cict.fr/2009.08.20>.
- [3] Hulton CSJ, Higgins CF, Sharp PM. ERIC sequences: a novel family of repetitive elements in the genomes of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and other enterobacteria. *Molecular Microbiology*, 1991, 5(4):825 – 834.
- [4] 刘佳妍,金莉莉,王秋雨. 细菌基因组重复序列 PCR 技术及其应用. 微生物学杂志(*Journal of Microbiology*), 2006, 26(3):90 – 93.
- [5] Ausubel FM, Brent R, Kingston RE. 精编分子生物学实验指南. 颜子颖, 等译. 北京: 科学出版社, 1998.
- [6] Smita S, Pawas G, Rameshwar S, et al. Application of molecular identification tools for *Lactobacillus*, with a focus on discrimination between closely related species: A review. *Food Science and Technology*, 2009, 42:448 – 457.
- [7] Chun SR, John W, Czajka D, et al. Characterization of the *Lactobacillus casei* group and the *Lactobacillus acidophilus* group by automated ribotyping. *Microbiology & Immunology*, 2001, 45(4): 271 – 275.
- [8] Uta P, Zngo S. Minipreparation method for isolation of DNA from plant with a high content of polyphenolics. *Nucleic acids research*, 1993, 21(4):3328 – 3330.
- [9] Michael B, Antonia V, Alfonso N, et al. Ribotyping and 16S rRNA gene sequencing for identification of brewery *Pedococcus* isolates. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 67(2):553 – 560.
- [10] Johnson JR, O' Bryan T. Improved repetitive-element PCR fingerprinting for resolving pathogenic and nonpathogenic phylogenetic groups within *Escherichia coli*. *Clinical and Vaccine Immunology*, 2000, 7:265 – 273.
- [11] Lee TM, Chang CY, Chang LL, et al. One predominant type of genetically closely related *Shigella sonnei* prevalent in four sequential outbreaks in school children. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 2003, 45:173 – 181.
- [12] Loubinoux J, Lozniewski A, Lion C, et al. Value of enterobacterial repetitive intergenic consensus PCR for study of *Pasteurella multocida* strains isolated from mouths of dogs. *Journal of Clinical Microbiology*, 1999, 37:2488 – 2492.
- [13] Angela M, Yeshwant R, Mehta B, et al. ERIC-and REP-PCR amplify non-repetitive fragments from the genome of *Drechslera avenae* and *Stemphylium solani*. *FEMS Microbiology Letters*, 2002, 211:51 – 55.
- [14] Johnson JR, Clabots C, Azar M, et al. Molecular analysis of a hospital cafeteria-associated salmonellosis outbreak using modified repetitive element PCR fingerprinting. *Journal of Clinical Microbiology*, 2001, 39: 3452 – 3460.
- [15] Kam TL, Rob M, Yuan-Ching T, et al. A comparison of AFLP and ERIC-PCR analyses for discriminating *Escherichia coli* from cattle, pig and human sources. *FEMS Microbiology Ecology*, 2004, 47:111 – 119.
- [16] Ahmed W, Tucker J, Harper J, et al. Comparison of the efficacy of an existing versus a locally developed metabolic fingerprint database to identify nonpointsources of faecal contamination in a coastal lake. *Water Research*, 2006, 40(12):2339 – 2348.
- [17] Elizabeth A. Casareza S, Suresh D. et al. Genotype diversity of *Escherichia coli* isolates in natural waters determined by PFGE and ERIC-PCR. *Water Research*, 2007, 41:3643 – 3648.
- [18] Casarez EA, Pillai SD, Mott J, et al. Direct comparison of four bacterial source tracking methods and a novel use of composite data sets. *Journal of applied microbiology*, 2007, 103(2):350 – 364.
- [19] Marco V, Ralf Z. Specific identification and molecular typing analysis of *Lactobacillus johnsonii* by using PCR-based methods and pulsed-field gel electrophoresis. *FEMS Microbiology Letters*, 2002, 217:141 – 154.
- [20] Sahilah AM, Son RG, Rusul L, et al. Molecular typing of *Salmonella weltevreden* and *Salmonella chincol* by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) and enterobacterial repetitive intergenic consensus-polymerase chain reaction (ERIC-PCR). *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. 2000, 16:621 – 624.

Biodiversity of *Lactobacilli* from fermented milk products in Northern Tibet

Ning Ju, Jiachao Zhang, Zhihong Sun, Wenjun Liu, YeJin, Heping Zhang, Tiansong Sun*

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

Abstract: [Objective] In order to study the biodiversity of *Lactobacilli* from Northern Tibet in China, we developed enterobacterial repetitive intergenic consensus sequence polymerase chain reaction (ERIC-PCR) technique. [Methods] Seventy seven *Lactobacillus* strains were isolated from traditional fermented milk products which are made by herd man families in Northern Tibet of China. By ERIC-PCR technique method, using NTSYS-pc2.1 software, we investigated the biodiversity of the strains. [Results] The amplified bands of ERIC-PCR were clear and stable with high repetition and high polymorphisms. The cluster analysis showed that at level 0.73, 77 tested strains were clustered into 4 groups: A1: strains of *Lactobacillus casei* (35.06% of the strains), A2: strains of *Lactobacillus fermentum* (61.04% of the strains), A3: strains of *Lactobacillus helveticus* and A4: strains of *Lactobacillus plantarum*. The biodiversity of the isolates from A1 and A2 groups was further investigated. A1 could be divided into 5 genotypes at the similarity of 80.0%. A2 could be divided into 6 genotypes at the similarity of 84.0%. [Conclusion] Using ERIC-PCR technique, *Lactobacilli* from Northern Tibet could be distinguished at species level.

Keywords: Northern Tibet; traditional fermented milk; *Lactobacillus*; biodiversity; ERIC-PCR

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30660135, 30800861), the National High Technology Research and Development Program of China (2006AA10Z345, 2007AA10Z353) and the earmarked Fund for Modern Agro-industry Technology Research System of China

* Corresponding author. Tel: +86-471-4308629; Fax: +86-471-4307205; E-mail: sts9940@sina.com

Received: 28 June 2009/Revised: 27 August 2009

科学出版社新书推介(2009 - 09)

家畜性别控制技术

(应用生物技术大系丛书)

李喜和 主编

978-7-0-025186-2 ¥ 45.00 2009年9月出版

内容简介: 本书共分七章, 内容以家畜胚胎的性别鉴定和移植、精子分离性控冻精的生产和人工授精为主线, 同时涉及哺乳动物性别分化和性别决定机制、雌雄家畜生殖周期特点以及相关的动物克隆技术、动物干细胞研究和转基因技术的研究和应用情况。在内容写作方面, 以编著者多年来进行研究和应用积累的一手资料为主, 注重实际操作细节和典型事例介绍。

本书是一部理论内容和应用技术兼顾的实用性生物技术书籍, 同时也对从事生殖生物学、发育生物学、繁殖学、兽医学和生殖生物工程技术的科研和教学人员具有一定的参考价值。



欢迎各界人士邮购科学出版社各类图书(免邮费)

邮购地址 北京东黄城根北街16号 科学出版社 科学出版中心 生命科学分社 邮编: 100717

联系人: 李韶文(010-64000849) 周文宇(010-64031535)

更多精彩图书请登陆网站 <http://www.lifescience.com.cn> 欢迎致电索要书目