

不同来源鼠李糖乳杆菌的随机扩增多态 DNA 分析*

顾瑞霞¹, 杨振泉¹, 蔡敬敬¹, 李正华², 陈顺利², 罗珍兰¹

(¹扬州大学乳品研究所, 扬州 225001)

(²统一企业(中国)投资有限公司, 昆山 215300)

摘要:【目的】建立鼠李糖乳杆菌(*Lactobacillus rhamnosus*, Lr)菌株之间的分子鉴别方法并分析不同分离株之间的遗传多样性。【方法】从 56 份采集自中国新疆和田和广西巴马瑶族自治县的长寿老人粪便样本中分离得到的乳酸菌中, 经生理生化分析和 API 50CHL 试验条鉴定, 获得 10 株 Lr。对 10 株 Lr 分离株和 1 株 Lr 标准株 ATCC7469 进行了随机扩增多态 DNA 分析, 从 50 条随机引物中筛选到 5 条在菌株水平上具有鉴别力的引物 P14、OPG28、OPG25、P7 和 P4 并建立和优化了 Lr 菌株 RAPD 指纹图谱扩增方法。根据 RAPD 结果计算菌株间的遗传相似系数并进行聚类分析。【结果】获得了清晰稳定的 DNA 指纹图谱, 扩增产物大小在 100~2000bp 之间, 菌株间呈现显著的 DNA 多态性, 不同来源的 Lr 分离株的遗传相似系数在 0.581~0.935 之间, 在相似系数 0.80 水平上可以将 11 株 Lr 菌株分为 5 个类群, 其中分离自新疆和田的 Lr 菌株归在类群 B 和类群 C, 而分离自广西巴马瑶族自治县的 Lr 菌株归在类群 D 和类群 E。【结论】应用 RAPD 方法对 Lr 菌株进行分子鉴别是可行的, 不同来源的 Lr 之间存在着较大的种内遗传多态性和不同的亲缘关系。

关键词: 鼠李糖乳杆菌; 指纹图谱; 多态性; 聚类分析

中图分类号: Q939 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2008) 04-0426-06

鼠李糖乳杆菌(*Lactobacillus rhamnosus*, Lr)是近年来研究较多的益生菌之一, 具有保持肠道微生态平衡, 提高肠道抵抗疾病能力和消除过敏等功能^[1]。不同的 Lr 菌株之间的定植能力, 调节微生物平衡能力以及培养特性具有较大的差异^[2], 因此, 建立快速的菌株之间的鉴别技术, 对于高效筛选益生功能的 Lr 菌株具有重要意义。

传统的分类鉴定方法建立在表型和生理生化特征的基础上, 难以区别种内间的差异。16S rDNA 基因序列同源性分析作为乳酸菌的系统发育和亲缘关系研究已被普遍接受和广泛应用, 但是, 16SrDNA 同源性分析使鼠李糖乳杆菌的鉴别只能达到种的水平^[3], 不能区别种内菌株之间的差异。随机扩增多态 DNA

(Random Amplified Polymorphic DNA, RAPD)分析能鉴别不同种间乃至不同菌株之间存在的差异, 能准确和快速的鉴别乳酸菌^[4], 目前在种属特异性鉴定及基因水平种内分型中已得到高度重视和广泛应用^[5, 6]。

新疆和田和广西巴马瑶族自治县是我国 2 个长寿之乡。本研究从 56 份采集自中国新疆和田和广西巴马瑶族自治县的长寿老人粪便样本中分离到 10 株 Lr, 并将 Lr 分离株和 1 株 Lr 标准株 ATCC7469 的基因组 DNA 进行 RAPD 分析, 旨在建立不同 Lr 菌株之间的分子鉴别方法, 并探讨不同环境和地域的人群肠道内的 Lr 的遗传多样性及其亲缘关系和分子差别, 为开发具有益生功能的 Lr 资源奠定基础。

基金项目: 国家“863 计划”(2007AA10Z357); 国家“十一五”科技支撑计划(2006BAD04A17); 江苏省“六大人才高峰”计划(06-B-042)
作者简介: 顾瑞霞(1963-), 男, 江苏扬州人, 博士, 教授, 主要从事乳酸菌研究。Tel: +86-514-87978128; Fax: +86-514-87313372; E-mail: rxgu@yzu.edu.cn
收稿日期: 2007-09-07; 修回日期: 2007-12-27

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 样本采集:扬州大学乳品研究所于 2002 年 4 月至 2003 年 8 月分别从广西巴马瑶族自治县和新疆和田地区采集 90 岁以上长寿老人粪便样品 56 份,其中:女性 35 人(62.5%), 男性 21 人(37.5%); 广西 38 人(67.8%)、新疆 18 人(31.2%); 100 岁以上 15 人(26.8%), 90~99 岁 41 人(73.2%)。将样品低温下保存于保护液中, 取回后 2 日内分离乳酸菌。

1.1.2 主要仪器和试剂:PTC-100TM 型 PCR 仪为美国 MJ Research 公司产品; UV-VIS 型紫外可见分光光度计为上海棱光技术有限公司产品; GIS-1000 凝胶成像系统为上海天能仪器设备有限公司产品。API 50CHL 试剂条购自法国梅里埃生物有限公司; 实验中所用的 50 条随机引物、*Taq* DNA 聚合酶、dNTPs 和 RNase 均购自上海生物工程公司; 其它常规试剂为国产分析纯。

1.2 乳酸菌的分离和鉴定

PTYG 培养基、Elliker 琼脂培养基和改良 MRS 培养基以及乳酸菌分离按文献^[7]所述方法进行, 将分离、纯化的乳酸菌接种于脱脂乳培养基中连续活化培养 2~3 代, 每代为 37 培养 24h, 按凌代文等^[7]方法并结合法国梅里埃生物有限公司 API 50CHL 试剂条说明书对乳酸菌进行鉴定。本研究中所分离和鉴定的鼠李糖乳杆菌菌株及来源如表 1。

1.3 基因组 DNA 的提取

将已纯化的 Lr 菌种接种于脱脂乳培养基中, 活化培养 2~3 代, 每代 37 培养 24h。基因组 DNA 提取方法参考文献^[8]进行并有所改进, 在酚: 氯仿: 异戊醇抽提前加入 1.2mol/mL NaCl 和 10%(W/V) CTAB 提高破壁效果, 提取后的基因组 DNA 样品用紫外分光光度计检测 OD₂₆₀ 和 OD₂₈₀, 取 10 μ L 样品经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的完整性。

表 1 本研究中所采用的鼠李糖乳杆菌菌株
Table 1 *Lactobacillus rhamnosus* used in this study

Samples No.	Strain	Sample sites	Collecting date	Sources
1	ATCC 7469	Unknown	Unknown	China General Microbiological Culture Collection Center
2	R18	新疆和田/Hetian, Xinjiang	18/08/2003	Feces samples of longevous people
3	LV108	广西巴马/Bama, Guangxi	25/04/2002	Feces samples of longevous people
4	F	新疆和田/Hetian, Xinjiang	18/08/2003	Feces samples of longevous people
5	R02	新疆和田/Hetian, Xinjiang	18/08/2003	Feces samples of longevous people
6	R20	新疆和田/Hetian, Xinjiang	18/08/2003	Feces samples of longevous people
7	R26	新疆和田/Hetian, Xinjiang	18/08/2003	Feces samples of longevous people
8	R04	新疆和田/Hetian, Xinjiang	18/08/2003	Feces samples of longevous people
9	R13	新疆和田/Hetian, Xinjiang	18/08/2003	Feces samples of longevous people
10	LV01	广西巴马/Bama, Guangxi	10/07/2002	Feces samples of longevous people
11	LV02	广西巴马/Bama, Guangxi	10/07/2002	Feces samples of longevous people

1.4 随机引物的筛选以及 PCR 扩增

以 11 株不同的 Lr 菌株的基因组 DNA 为模板, 试用 50 条随机引物进行 RAPD-PCR 扩增。反应采用 25 μ L 反应体系, 扩增程序为: 93 2min, 36 1min, 72 2min, 1 次循环; 93 1min, 36 1min, 72 2min, 40 次循环; 93 1min, 36 1min, 72 10min, 1 次循环。扩增完毕, 在 1.2% 琼脂糖凝胶上, 0.5 μ g/mL EB 染色后, 在凝胶成像系统上拍片分析, 每次实验重复 2 次。

1.5 RAPD 多态性谱带分析

选用重复性好的扩增谱带做统计分析, 按 Nei 等^[9]公式 $F = 2N_{xy} / (N_x + N_y)$ 计算不同菌株间的遗传相似系数, 其中 F 是菌株 X 和 Y 的遗传相似系数, N_{xy} 是菌株 X 和 Y 共同具有的带数, N_x 和 N_y 分别是菌株 X 和 Y

扩增的带数。将 11 个菌株对应的扩增谱带按“1”和“0”进行统计, 将数据输入计算机, 建立数据矩阵。用 NTSYS 统计软件采用邻接法(Neighbor joining)进行聚类分析。

2 结果和分析

2.1 乳酸菌的生理生化鉴定

从广西巴马瑶族自治县和新疆和田地区长寿老人粪便样品中共分离获得 812 株产酸菌, 在对其进行性能初步研究基础上, 鉴定了 126 株乳酸菌, 共获得 10 株鼠李糖乳杆菌(表 1), 均为革兰氏阳性、细胞形态为杆状, 不能形成芽孢, 接触酶、氧化酶阴性, O/F 试验发酵, 能够产生乳酸, 在 15 和 6.5%NaCl 不能

生长, pH4.5 能够生长, pH9.6 不能生长。利用法国梅里埃公司的 API 50CHL 试验条鉴定, 并利用 API 鉴

定软件系统分析, 表明这 10 株乳酸菌 98.6%~99.9% 为鼠李糖乳杆菌(表 2)。

表 2 鼠李糖乳杆菌分离株的鉴定结果

Table 2 Identification of *Lactobacillus rhamnosus* isolates

No.	Carbohydrates	Isolates									
		R18	LV108	F	R02	R20	R26	R04	R13	LV01	LV02
1	CTRL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	GLY	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	ERY	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	DARA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	LARA	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-
6	RIB	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
7	OXYL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	LXYL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9	ADD	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	MDX	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11	GAL	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
12	GLU	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
13	FRU	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
14	MNE	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
15	BBE	-	+	+	+	+	+	+	+	+	v
16	RHA	-	+	+	+	+	+	+	+	+	v
17	DUL	-	v	-	+	-	+	-	-	-	-
18	INO	-	+	-	v	v	-	v	+	-	-
19	MAN	-	+	+	+	+	+	+	+	+	v
20	SOR	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
21	MDM	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-
22	MDO	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-
23	NAO	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
24	AMY	+	+	+	+	v	+	+	+	-	+
25	ARB	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
26	ESC	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
27	SAL	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
28	CEL	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
29	MAL	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
30	LAC	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
31	MEL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
32	BAC	-	+	+	+	-	+	+	-	-	v
33	TRE	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
34	INU	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
35	MLZ	-	-	+	v	-	-	+	+	+	+
36	RAF	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
37	AMD	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+
38	GLYG	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
39	XLT	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
40	GEN	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
41	TUR	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+
42	LYX	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
43	TAG	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
44	DFUC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
45	LFUC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
46	DARL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
47	LARL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
48	ONT	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
49	2KG	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
50	5KG	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
%ID		98.6%	99.7%	99.9%	99.9%	99.6%	99.9%	99.7%	99.7%	99.7%	99.2%

+ indicated positive reaction; - indicated negative reaction; v indicated variable.

2.2 基因组 DNA 的浓度及纯度

不同 Lr 菌株经上述方法提取后的基因组 DNA, 经紫外分光光度计检测, OD_{260}/OD_{280} 比值在 1.80~1.90, DNA 总量为 15~20 μ g, 取 10 μ L 经 1.2% 琼脂糖凝胶上电泳, 电泳分析结果能够显示单一清晰的条带, 表明 DNA 浓度与纯度以及完整性符合 RAPD 技术要求。

2.3 随机引物的筛选

应用 50 条随机引物分别对不同的 Lr 菌株 RAPD-PCR 进行了扩增, 结果显示 P14、OPG28、OPG25、P7 和 P4 五条随机引物具有较丰富的多态性扩增条带, 其碱基序列及多态性谱带统计如表 3 所示。

表 3 随机引物的筛选与扩增结果

Table 3 RAPD amplified results with five selected random primers

Primer	Sequence (5' -3')	Amplified bands	Polymorphism bands
P14	AGGTTGCAGG	10	7
OPG28	AGGCATCGTG	9	6
OPG25	GGAAGTCCTG	11	8
P7	CTACGCTCAC	10	9
P4	GTGTGCCCCA	12	11

2.4 不同 Lr 菌株的 RAPD 指纹图谱

不同 Lr 菌株扩增 RAPD 指纹图谱如图 1 所示, 从图中可以看出: 筛选到的随机引物对于 Lr 菌株基因组 DNA 模板都能够产生较丰富的扩增产物并且在菌

株之间具有较好的多态性, 扩增产物分子量大小在 100~2000bp 之间, 不同的 Lr 菌株扩增的指纹图谱存在一定的差异, 显示了不同 Lr 菌株基因组 DNA 碱基序列的差异性。根据建立的指纹图谱可以对不同的 Lr 菌株进行分子鉴别。

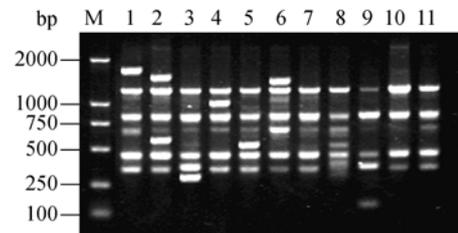


图 1 11 株不同来源的鼠李糖乳杆菌的 RAPD 指纹图谱
Fig. 1 RAPD fingerprints of 11 strains of *Lactobacillus rhamnosus* from different origins. M. 100~2000bp DNA marker; 1. ATCC7469; 2. R18; 3. LV108; 4. F; 5. R02; 6. R20; 7. R26; 8. R04; 9. R13; 10. LV01; 11. LV02.

2.5 不同 Lr 菌株之间的遗传相似系数分析

将 11 株不同的 Lr 菌株的 RAPD 指纹图谱进行统计分析, 按 Nei 氏公式计算不同菌株间的遗传相似系数, 结果如表 4 所示, 从表中可以看出不同来源的 11 株鼠李糖乳杆菌菌株之间的遗传相似系数在 0.581~0.935 之间, 反映出较高的遗传差异性。其中 ATCC7469 和 LV108 之间的遗传相似系数最小, 为 0.581; 而 R20 和 R26 的遗传相似系数最大, 为 0.935, 表现出较高的同源性。

表 4 11 株的鼠李糖乳杆菌 RAPD 扩增共同片段及遗传相似系数

Table 4 RAPD amplified common fragments and genetic similarity coefficients of 11 *Lactobacillus rhamnosus*

Strain	ATCC7469	R18	LV108	F	R02	R20	R26	R04	R13	LV01	LV02
ATCC7469	28	0.759	0.581	0.808	0.677	0.667	0.738	0.615	0.607	0.702	0.642
R18	22	30	0.656	0.835	0.719	0.613	0.687	0.597	0.621	0.746	0.727
LV108	18	21	34	0.586	0.618	0.636	0.648	0.620	0.581	0.667	0.644
F	21	22	17	24	0.793	0.679	0.656	0.623	0.654	0.717	0.776
R02	21	23	21	23	34	0.697	0.704	0.704	0.645	0.698	0.712
R20	20	19	21	19	23	32	0.935	0.783	0.700	0.721	0.772
R26	24	23	23	20	25	26	37	0.676	0.646	0.667	0.677
R04	20	20	22	19	25	27	25	37	0.615	0.667	0.710
R13	17	18	18	17	20	21	21	20	28	0.667	0.755
LV01	20	22	21	19	22	22	22	22	19	29	0.871
LV02	17	20	19	19	21	22	21	22	20	24	25

The total amplified bands of strains in the table are expressed in bold, the common bands between strains are expressed by the figures at the bottom of diagonal, genetic similarity coefficients between strains are indicated with italics.

2.6 聚类分析

将 11 个 Lr 菌株对应的扩增谱带有无以“1”和“0”进行统计, 将数据输入计算机, 建立数据矩阵, 进行聚类分析。结果显示(图 2), 在相似系数 0.80 水平上

可以将 11 株 Lr 菌株分为 5 个类群(A-E): 类群 A 包含 ATCC7469 一个菌株; 类群 B 包含 F 和 R02 两个菌株; 类群 C 包含 R13, R18, R04, R20 和 R26 共 5 个菌株; 类群 D 包含 LV01 和 LV02 两个菌株; 类群 E 包含

LV108 一个菌株。分离自新疆和田县的所有 Lr 菌株归在类群 B 和类群 C 中, 而分离自广西巴马自治县的菌株归在类群 D 和类群 E 中, 分离自相同地区不同个体的分离株之间也表现出不同的遗传相似系数, 反映了 Lr 菌株的遗传多样性。

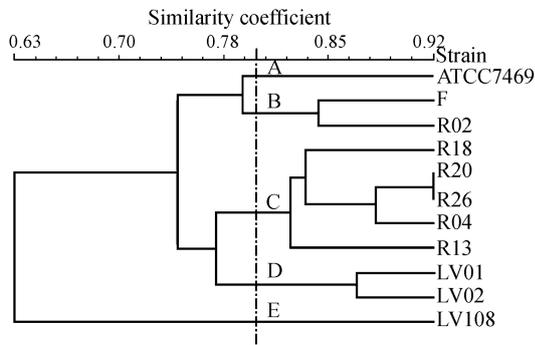


图 2 11 株鼠李糖乳杆菌的聚类树状图

Fig. 2 The cluster dendrogram of 11 strains of *Lactobacillus rhamnose* A, B, C, D and E represent different groups divided at the level of 0.80 similarity.

3 讨论

益生菌的遗传多样性与其适应能力、生存能力和进化密切相关, 了解不同环境和地域的人群肠道内的益生菌的遗传多样性对开发益生菌资源具有重要意义。另一方面, 不同益生菌的功能特性和加工特性存在菌株差异性, 需要在种内株间进行区分和鉴别。传统的分类鉴定方法建立在表型和生理生化特征的基础上, 难以区别种内的差异。随机扩增多态 DNA 技术是 1990 年 William 等^[9]建立的一种新的揭示基因组多态性的方法, 其原理为采用一条随机寡核苷酸序列引物, 以基因组 DNA 为模板, 通过 PCR 扩增出能够显示多态性的 DNA 片段, 继凝胶电泳后呈现出不同的 DNA 指纹图谱, 利用不同的引物即使一个碱基对的差异也将导致扩增产物谱带特征的改变, 显示出新的多态性, 从而检测不同种间乃至不同菌株之间存在的差异。

本研究的 11 株鼠李糖乳杆菌, 其中 10 株来源于新疆和田和广西巴马瑶族自治县 56 份 90 岁以上长寿老人粪便样品中分离获得。通过 RAPD 分析, 在 50 条随机引物中筛选到了 5 条具有较好的多态性扩增结果的随机引物, 并获得了清晰稳定 RAPD 指纹图谱。结果显示本研究中不同来源的 11 株鼠李糖乳杆菌之间存在着较大的

种内遗传多态性, 根据菌株之间的遗传相似系数可以分成不同的类群, 类群之间显示出不同的亲缘关系。为益生菌菌种资源的开发和菌株之间的区分提供了参考数据。本研究中的鼠李糖乳杆菌 LV108 已经申请了国家发明专利(专利申请号: 200510111588.9, 中国微生物菌种保藏管理管理委员会普通微生物中心的保藏号为 CGMCC No.1531; 16SrDNA GenBankit901524 access No: EF534204)。

致谢 本论文研究得到了统一企业(中国)投资有限公司的资助, 在此表示感谢。

参 考 文 献

- [1] Gardiner GE, Heinemann C, Baroja ML, et al. Oral administration of the probiotic combination *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 and *L. fermentum* RC-14 for human intestinal applications. *International Dairy Journal*, 2002, 12 (3): 191-196.
- [2] Ruben GK, Anthony DE, Waa L, et al. Specific detection and analysis of a probiotic *Bifidobacterium* strain in infant feces. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, 23(5): 3668-3672.
- [3] Richard B, Groisillier A, Badet C, et al. Identification of salivary *Lactobacillus rhamnosus* species by DNA profiling and a specific probe. *Res Microbiol*, 2001, 152 (39): 157-65.
- [4] Tilsala-Timisjarvi A, Alatosava T. Strain-Specific identification of probiotic *Lactobacillus rhamnosus* with randomly amplified polymorphic DNA-Derived PCR primers. *Appl Environ Microbiol*, 1998, 64(12): 4816-4819.
- [5] Castellanos MI, Chauvet A, Deschamps A, et al. PCR Methods for identification and specific detection of probiotic Lactic acid bacteria. *Current Microbiology*, 1996, 33 (1): 100-103.
- [6] Akopyanz N, Bukanoy NO, Weslftblom IV, et al. DNA diversity among clinical isolates of *Helicobacter pylori* detected by PCR based RAPD fingerprinting. *Nucleic Acids Res*, 1992, 36(20): 5137-5142.
- [7] 凌代文, 东秀珠. 乳酸细菌分类鉴定及实验方法. 第 1 版. 北京: 中国轻工业出版社, 1999.
- [8] Manual J, Sambrook EF, Fritsch T, et al. 分子克隆实验指南. 第 2 版. 北京: 科学出版社, 1992.
- [9] Nei M, Li WH. Mathematical model for study genetic variation in terms of restriction endonuclease. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1979, 76(6): 5269-5273.
- [10] Williams JGK, Kubelik AR., Livak KL, et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res*, 1990, 86 (18): 6531-6535.

Analysis of Different *Lactobacillus rhamnosus* by Random Amplified Polymorphic DNA

Ruixia Gu^{1*}, Zhenquan Yang¹, Jingjing Cai¹, Zhenghua Li², Shunli Chen², Zhenlan Luo¹

(¹ Institute of Dairy Science and Technology, Yangzhou University, Yangzhou 225001, China)

(² President Enterprises Food Company, Kunshan 215300, China)

Abstract: [Objective] We developed a molecular method to mark and differentiate *Lactobacillus rhamnosus* strains and to analyze genetic diversity among isolates from different sources. **[Methods]** Ten strains of *Lactobacillus* spp. were isolated from 56 feces samples of elderly people above 90 years of age in regions of Hetian, Xinjiang and Bama, Guangxi, China. We used API 50CHL test chip for strain identification. These isolates belonged to *Lactobacillus rhamnosus* with 98.6%~99.9% satisfactory. Ten *L. rhamnosus* isolates and one reference strain ATCC7496 were analyzed by random amplified polymorphic DNA (RAPD) technique to differentiate *L. rhamnosus* strains at molecular level. We screened 5 random primers named P14, OPG28, OPG25, P7 and P4 and developed optimum RAPD amplifying system. **[Results]** The clear and stable DNA fingerprints of each strain were obtained; the amplicon size ranged from 100 to 2000 bp, and the band patterns showed polymorphism among different *L. rhamnosus* strains. Genetic similarity coefficients based on RAPD patterns varied from 0.581 to 0.935, which suggested genetic diversity and different genetic relationship among these strains. Eleven strains of *Lr* could be clustered into 5 groups (group A to E) at the level of 80% similarity. Seven *L. rhamnosus* strains isolated from Hetian, Xinjiang, were grouped in group B and C, 3 isolates from Bama, Guangxi, were grouped in group D and E. **[Conclusion]** RAPD method is feasible for molecular mark and differentiation of *L. rhamnosus* strains and high level of genetic diversity and different relationship are found among *L. rhamnosus* isolates.

Keywords: *Lactobacillus rhamnosus*; fingerprinting; polymorphic; cluster analysis

Supported by the National Programs for High Technology Research and Development of China (2007AA10Z357) and the Chinese National Programs for Science and Technology Development (2006BAD04A17)

*Corresponding author. Tel: +86-514-87978128; Fax: +86-514-87313372; E-mail: rxgu@yzu.edu.cn

Received: 7 September 2007/ Revised: 27 December 2008

审阅和查询 2007 年稿件的方法

自 2006 年本刊开通了“稿件远程处理系统”后,先后使用了两套编辑软件,这两套编辑软件是分别在两个不同的网页下操作的,审阅和查询不同年代所投稿件的方法也是不同的,具体如下:

1. 两套网页的页眉采用的颜色不同,新网页是黄色,旧版网页是绿色。
2. 新网址为 <http://journals.im.ac.cn>, 2008 年 2 月 19 日原网址(<http://journal.im.ac.cn/xuebao>)受损,无法使用。提醒专家和作者,审阅和查询 2007 年的稿件只能从新版网页的“旧版入口”进入。
3. 在新网页首页的右上角处设置了“旧版入口”,2007 年 12 月 31 日之前的来稿(即:稿号为 xb2007-xxx 的稿件),依然使用原网页进行投稿、查询和审稿,直到稿件处理终结为止。
4. 2008 年 1 月 1 日后的投稿(即:稿号为 xb2008xxx 的稿件),在新的网页中查询和审稿。

由此会给作者和专家带来不便,敬请谅解!