

代表性差异分析比较两株来自不同地区的猪源 *Lactobacillus* 菌株

苏勇, 姚文, 朱伟云*

(南京农业大学消化道微生物研究室, 南京 210095)

摘要:【目的】对分离自猪肠道的乳酸杆菌 S1 菌株进行鉴定, 并比较该菌株与同种的 001^T 菌株的基因差异。【方法】对 S1 菌株进行 16S rRNA 基因序列分析和种特异 PCR 检测, 并且对 S1 菌株和 *Lactobacillus sobrius* 001^T 进行代表性差异分析 (Representational difference analysis, RDA)。【结果】16S rRNA 基因序列分析表明, 与 S1 菌株最相似的已知菌为 *L. sobrius*。变性梯度凝胶电泳分析显示, 仔猪空、回肠细菌图谱中有一与 S1 菌株有相同迁移位置的优势条带, 克隆、测序鉴定表明, 与该条带相匹配的 16S rRNA 基因克隆 (Clone S) 的最相似已知菌也为 *L. sobrius*。16S rRNA 基因系统进化分析表明, S1 菌株与 Clone S 和 *L. sobrius* 16S rRNA 基因序列同源性分别为 99.8% 和 99.6%。*L. sobrius* 特异性引物也可以扩增 S1 菌株的 16S rRNA 基因的特定片段。因此 S1 菌株可被确定为 *L. sobrius*。RDA 对菌株 S1 和同种的猪源 *L. sobrius* 001^T 菌株的基因差异进行分析, 未发现这两株菌的基因组差异。【结论】猪肠道乳杆菌 S1 菌株属于 *L. sobrius*, 其与猪源 *L. sobrius* 001^T 菌株为相似菌株。

关键词: *Lactobacillus sobrius*; 代表性差异分析; 猪肠道乳酸杆菌

中图分类号: S811.6 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2008) 05-0577-06

乳酸杆菌是仔猪小肠中的优势菌, 它们对维持宿主肠道功能和健康起有益作用^[1]。近来的研究发现, *Lactobacillus sobrius* (*L. sobrius*) 是仔猪肠道乳酸杆菌菌群中的优势菌^[2,3]。*L. sobrius* 001^T 菌株由荷兰 Wageningen 大学微生物实验室分离自仔猪肠道^[3]。*Lactobacillus* sp. S1 菌株由本研究室分离自仔猪肠道食糜。研究表明, 这两个菌株均具有较好的体外益生特性^[4,5]。16S rRNA 基因序列分析是比较菌株间进化距离的常用方法, 基于其上的变性梯度凝胶电泳 (Denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE) 技术也可用于菌株的筛选, 通常认为在图谱中有相同条带位置的细菌就是同种细菌^[6]。然而, 进化距离很近的菌株间功能也有不同, 如 *Streptococcus suis* 有 35 个血清型, 各个血清型

菌株的致病性却有很大差异^[7]。因此, 基于全基因组比较菌株间的差异, 对于全面了解菌株间的差异、发掘菌株特异性的功能基因有重要意义。

代表性差异分析 (Representational difference analysis, RDA) 是最近发展起来的用于基因差异表达和筛选差异基因的一种新方法, 如发掘肿瘤细胞和正常细胞间的基因表达差异^[8,9]。近年来, 该技术也被引入在基因组水平比较细菌菌株间的基因差异, 并且结合克隆和序列分析人们还能发掘到菌株特异性的功能基因片段^[10,11]。本研究目的是利用序列分析技术及种特异 PCR 对 S1 菌株进行鉴定, 进而采用 RDA 技术在基因组水平上对这两株来自不同地区的猪源乳酸杆菌进行比较。

基金项目: 国家“973 项目”(2004CB1175004); 国家杰出青年科学基金(30025034)

*通讯作者: Tel: +86-25-84395523; E-mail: zhuweiyunnjau@hotmail.com

作者简介: 苏勇(1979-), 男, 江苏海安人, 博士研究生, 主要从事消化道微生物研究。E-mail: suney7912@yahoo.com

收稿日期: 2007-10-12; 修回日期: 2008-01-25

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株来源及培养: *L. sobrius* 001^T 由荷兰 Wageningen 大学微生物实验室惠赠, 分离自仔猪肠道^[3]; S1 菌株由本研究室分离自江苏某猪场仔猪肠道, 初步鉴定其属于 *Lactobacillus* 属。用 MRS 培养基 37℃ 下培养两菌株 24 h, 5000×g 离心 10 min, 无菌 PBS (pH 7.2) 冲洗, 收集菌泥。快速 DNA 提取试剂盒 (Qiagen) 提取细菌基因组 DNA, 用于 PCR 及 RDA 分析。

1.1.2 主要试剂和仪器: DNA 提取试剂盒、DNA 纯化试剂盒 (Qiagen); pGEM-T 载体 (Promega); Taq 酶、dNTP, 引物合成和序列测定 (Invitrogen); PCR

仪 (Göttingen), DCode 系统、GS-800 灰度扫描仪 (Bio-Rad)。

1.1.3 仔猪肠道样品采集: 选取江苏某猪场产期相近、胎次相似的 6 窝仔猪 (杜×长×大), 21 日龄 (断奶前) 每窝随机屠宰一头仔猪, 于冰面上以无菌方式收集仔猪空、回肠食糜样品, -20℃ 下保存。

1.2 16S rRNA 基因的 PCR/DGGE 分析

参照 Zoetendal 等^[12]的方法, 先用珠磨法机械破碎肠道食糜样品, 而后用酚和氯仿/异戊醇提取其总 DNA。本研究用引物及核苷酸序列见表 1。采用一对细菌通用引物 U968-GC 和 L1401 对总细菌的 16S rRNA 基因的 V6-V8 可变区片段进行 PCR 扩增^[13]。参照 Muyzer 等^[14]的方法, 对 PCR 扩增产物进行 DGGE 分析。DGGE 用 8% 聚丙烯酰胺凝胶 (含丙酰

表 1 本研究所用寡核苷酸序列
Table 1 List of DNA oligonucleotides used in this study

Oligonucleotide	Sequence(5' 3')	Reference
U968-GC	CGCCCGGGCGCGCCCCGGGCGGGGCGGG GGCACGGGGGAACGCGAAGAACCTTAC	[13]
L1401	CGGTGTGTACAAGACCC	[13]
8f	CACGGATCCAGAGTTTGAT(C/T)(A/C)TGGCTCAG	[15]
1510r	GTGAAGCTTAGGG(C/T)TACCTTGTACGACTT	[15]
T7-long (THEBEN)	TTTCTAATACGACTCACTATAGGCCGCCAGCG	[11]
SP6-long (SPARTA)	TTTATTTAGGTGACACTATAGATTAGGCCGCCAGCG	[11]
Short (KORINT)	CTGGCGGCCTACCA	[11]
T7-RDA	AATACGACTCACTATAG	[10]
SP6-RDA	ATTTAGGTGACACTATAGA	[10]
T7	TAATACGACTCACTATAGG	Promega
SP6	GATTTAGGTGACACTATAG	Promega
Lab0159	CGGTATTAGCACCTGTTTCC	[16]
L-*OTU171-0077-a-S-2	ACTTCGTAATGACGTTG	[11]

胺、二丙酰胺、尿素、甲酰胺和甘油), 尿素浓度梯度为 38%~51%。电泳结束后, 进行硝酸银染色, 凝胶显色定影后用 GS-800 灰度扫描仪进行扫描。

1.3 16S rRNA 基因全序列及系统进化分析

一对细菌通用引物 8f 和 1510r 用于引导 S1 菌株和食糜样品细菌 16S rRNA 基因全序列的 PCR 扩增^[15]。S1 菌株的 PCR 扩增产物直接送至 Invitrogen 公司测序。食糜样品的扩增产物经 PCR 产物纯化试剂盒纯化后, 插入 pGEM-T 载体并转化入 *E. coli* JM109。以 T7 和 SP6 为引物进行 PCR 反应检测插入子的大小。插入子正确 (约 1.6kb) 的克隆扩增其 16S rRNA 基因的 V6-V8 区, 并与原样品在 DGGE 胶上进行比较, 与 S1 菌株条带相匹配的克隆送至 Invitrogen

公司测序。序列同源性通过互联网与 GenBank 数据库进行比较。本实验所测 S1 菌株 16S rRNA 基因及仔猪肠道细菌 16S rRNA 基因克隆序列均已被 GenBank 收录, 登录号分别为: DQ487214 和 DQ480421。

从 GenBank 数据库中获取 7 个乳酸杆菌和 1 个猪链球菌 (外类群) 的 16S rRNA 基因序列。采用 Clustalx1.81 和 MEGA 3.1 软件进行系统进化分析, 利用 Neighbor-joining 方法建立系统进化树, 因各 16S rRNA 基因序列间的长度差异, 该分析使用的 16S rRNA 基因长度约为 1440 bp。

1.4 *L. sobrius* 特异性 PCR 检测

L. sobrius 特异引物 L-*OTU171-0077-a-S-2^[11]

和乳酸杆菌特异引物 Lab0159^[16]用于检测两株菌的基因组 DNA 及其它乳酸杆菌 16S rRNA 基因克隆 DNA。PCR 反应条件为 94 5 min;而后 94 30 s, 60 20 s, 68 40 s, 35 个循环;68 最终延伸 3 min。PCR 反应产物用 1.2% 琼脂糖电泳进行检测。

1.5 代表性差异分析

参照文献[11]的方法。

1.5.1 基因组 DNA 酶解:利用 *Cfo*I 限制酶 (Promega) 37 下消化基因组 DNA 1.5 h, 消化反应体系为 20 μ L: 核酸约为 1 μ g, 限制酶 5 U, 牛血清白蛋白 (BSA) 100 ng 及限制酶缓冲液。

1.5.2 驱动 (Driver) 核酸片段与待测 (Tester) 核酸片段的制备:利用 T4DNA 连接酶将驱动接头 (Adaptor) 连接至酶解核酸片段, 反应体系 20 μ L: 8 μ L 酶解 DNA, 8 μ L 驱动接头 (50 mmol/L; 1:1 的 T7-long 和 Short 寡聚核苷酸), T4DNA 连接酶 400 U, 2 μ L 10 \times 缓冲液和 1 μ L BSA (25 ng/ μ L), 反应液混合后, 4 下 16 h。

利用 DNA 纯化试剂盒 (Qiagen) 去除残余驱动接头, 无菌水定容至 20 μ L。PCR 对 Driver 进行扩增, 采用 50 μ L 反应体系。反应条件为: 94 60 s;而后 94 15 s, 44 30 s, 68 90 s, 40 个循环; 68 4.5 min。DNA 纯化试剂盒对 PCR 产物进行纯化, 无菌水定容至 50 μ L, 该产物即为 Driver。利用 Driver 制备 Tester, 过程如下: 利用 10U 的 *Cfo*I 限制酶对 1 μ L 的 Driver 进行酶解, 反应体系 20 μ L。酶解产物的纯化如上所述, 以无菌水定容至 20 μ L。纯化产物用于连接新的接头 (50 mmol/L; 1:1 的 SP6-long 和 Short 寡聚核苷酸), 反应体系同上, 4 下 16 h 后进行纯化, 无菌水定量至 50 μ L, 该产物即为 Tester。

1.5.3 杂交反应与 Tester 扩增:Driver 和 Tester 各 5 μ L, 与 10 μ L 的 10 \times EE 缓冲液 (50 mmol/L 的 EPPS 和 5 mmol/L 的 EDTA, pH 8.0) 混合, 99 下变性 5 min 后, 不进行冷却, 直接加入 5 mol/L 的 NaCl 溶液 5 μ L, 67 下杂交 3 h。Tester 扩增 PCR 反应体系为 50 μ L, 反应液 (40 μ L, 包括: 10 \times PCR 缓冲液, 300 μ mol/L dNTP, 2.5 U Taq 酶, 无引物和模板) 首先在 68 预热, 待杂交反应结束, 直接加入 5 μ L 杂交液, 68 1 min 后, 4 冷却 3 min 后加入 5 μ L SP6-RDA 引物 (1 μ mol/L), 继而进行 PCR 扩增, 反应程序为 94 15 s, 44 30 s, 68 90 s, 45 个循环; 68 延伸 4.5 min。PCR 反应产物用 1.2% 琼脂糖

电泳进行检测。

2 结果和分析

2.1 S1 菌株 16S rRNA 基因序列分析及该种菌在仔猪空、回肠的分布

对 S1 菌株的 16S rRNA 基因进行序列分析, 结果显示, 与其最相似已知菌是 *L. sobrius* (99%, DQ487214)。利用该菌作为 Marker, 对 6 头来自不同窝的 21 日龄仔猪空、回肠样品的菌群进行 DGGE 分析, 由图 1 可见, 各样品图谱中均出现一优势条带, 而且该条带与 S1 菌株的条带位置一致 (图 1 方框内), 这表明该条带对应的细菌是仔猪空、回肠中的优势菌, 并且该菌与 S1 菌株为同种菌。通过对样品 16S rRNA 基因进行克隆, 得到了与该条带所匹配的克隆 (Clone S), 序列分析表明, 与其最相似的已知菌也是 *L. sobrius* (99%, DQ480421)。16S rRNA 基因系统进化分析表明 (图 2), S1 菌株, Clone S 和 *L. sobrius* 聚类于同一簇, 并且 S1 菌株与它们的 16S rRNA 基因序列同源性分别为 99.8% 和 99.6%。

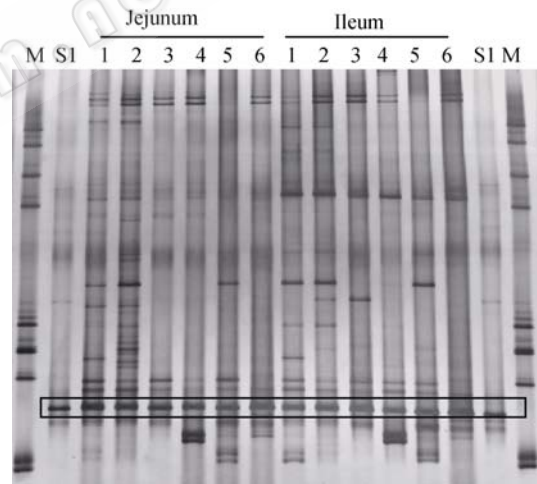


图 1 21 日龄 (断奶前) 仔猪空肠、回肠细菌 DGGE 图谱
Fig. 1 DGGE profiles from bacteria in jejunum and ileum of suckling piglets (21 d). M, Marker; S1, *Lactobacillus* sp. S1 strain; 1-6, litter numbers of the piglets.

2.2 *L. sobrius* 特异性 PCR 检测

利用 *L. sobrius* 特异性引物对 *L. sobrius* 001^T, S1 菌株及与 *L. sobrius* 相匹配的 Clone S 的核酸进行检测, 由图 3 可见, 它们均能扩增出长度约为 104bp 的产物, 而 *L. delbrueckii* subsp. 和 *L. pontis* 克隆未见条带。这一结果再次证实, S1 菌株也属于 *L. sobrius*。

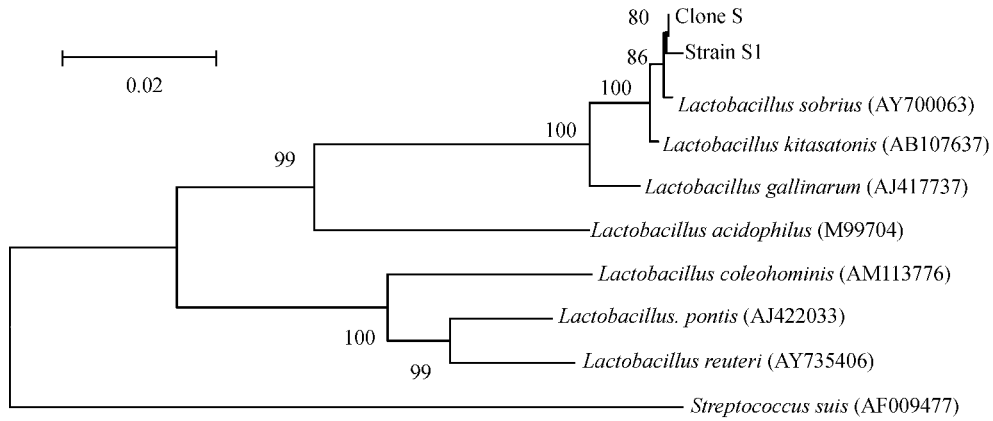


图2 S1菌株和克隆S的16S rRNA基因序列系统进化分析

Fig. 2 Phylogenetic tree of strain S1 and Clone S derived from 16S rRNA gene sequences. *Streptococcus suis* was used as an outgroup. The topology of the tree was estimated by bootstraps based on 1000 replications. Numbers at nodes are percentages supported by bootstrap evaluation. The reference bar indicates 2% sequence dissimilarity.

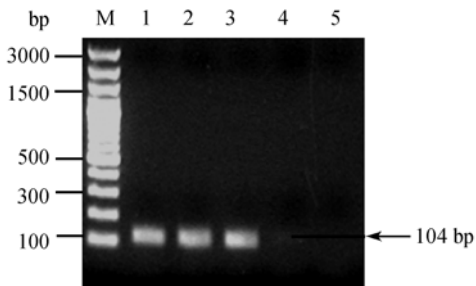


图3 Lactobacillus sobrius 特异性引物的PCR扩增

Fig. 3 PCR products obtained by using *Lactobacillus sobrius*-specific primers. M. Marker; 1, *L. sobrius* 001^T; 2, *Lactobacillus* sp. S1; 3. Clone S; 4. *L. delbrueckii* subsp. related clone; 5. *L. pontis* related clone.

2.3 RDA 分析

利用 RDA 技术在基因组水平进一步对同属于 *L. sobrius* 的 001^T 和 S1 菌株进行了比较。图 4 为限制酶 *Cfo* I 消化两株菌基因组 DNA 的产物，由图可见，消化产物的片段长度约为 500~3000 bp，平均约为 1000 bp，并且两株菌的基因组 DNA 酶解片段图谱非常相似。图 5 为酶解产物的 T7-RDA 引物扩增产物 - Driver，扩增产物片段的长度约为 400~1500 bp，这一结果说明酶解基因组 DNA 的产物中的小于 1500 bp 的片段比长片段在制备 Driver 过程中得到更多的富集。图 6 为扣除杂交后 SP6-RDA 引物 PCR 扩增结果，由图可见，无论是 S1 菌株作为 Tester，001^T 菌株作为 Driver，还是 001^T 菌株作为 Tester，S1 菌株作为 Driver，最终均未见 PCR 扩增产物；而仅使用 S1 菌株或 001^T 菌株作为 Tester 进行杂交时，SP6-RDA 引物 PCR

扩增后，可以得到长度约为 750~2000 bp 的核酸产物。这一结果说明，RDA 分析未发现 S1 菌株和 001^T 菌株基因组间的序列差异，因此推测这两株菌属于相似菌株。

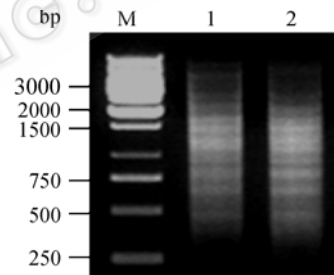


图4 两株菌基因组-限制酶 Cfo I 消化产物

Fig. 4 Products of genomic DNA of two strains digested with *Cfo* I. M. Marker; 1. strain 001^T; 2. strain S1.

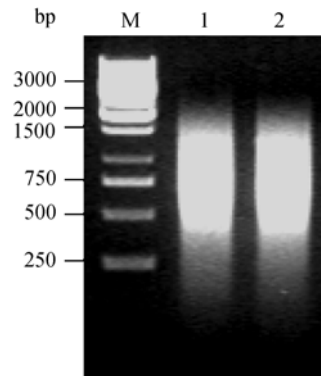


图5 Driver 扩增产物

Fig. 5 PCR products of Driver amplification by using primer T7-RDA. M. Marker; 1. strain 001^T; 2. strain S1.

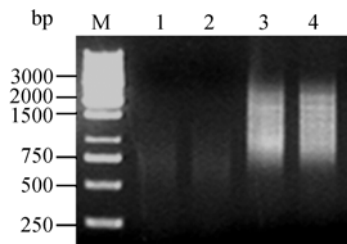


图 6 RDA 最终扩增产物

Fig. 6 PCR products of RDA amplification by using primer SP6-RDA. M. Marker; 1. Tester S1, Driver 001^T; 2. Tester 001^T, Driver S1; 3. Tester S1; 4. Tester 001^T.

3 讨论

乳酸杆菌作为动物肠道中重要的有益菌已经为人们所了解,它们通过竞争营养、肠上皮结合位点以及产生抑菌物质等来防止病原菌的定植和感染。近年来的研究表明,*L. sobrius* 是普遍存在于仔猪肠道中的优势乳酸杆菌^[2,3,17],因此,可以推测该菌可能在仔猪出生后肠道菌群的发育以及维持菌群平衡上都起着重要的作用。

16S rRNA 基因序列分析是鉴定细菌以及比较不同菌株的系统进化关系的常用方法,一般两菌株的 16S rRNA 基因序列间同源性大于 97%,就可以认为它们为同种菌^[18]。本研究中,S1 菌株与 *L. sobrius* 的 16S rRNA 基因序列同源性达到 99.6%,因此可认为该菌属于 *L. sobrius*。然而,16S rRNA 基因同源性很高的不同菌株的功能未必一致。RDA 技术能够基于基因组水平对细菌不同菌株进行比较,该技术利用 PCR 的指数扩增特点对某菌株特异性的核酸片段进行扩增,结合克隆和序列分析技术,就可以获得这一核酸片段。Konstantinov 等^[11]利用该技术获得的 *L. sobrius* 001^T 特异基因序列片段,并以此设计该菌株特异性的引物成功地用于 real-time PCR 定量分析。该技术也成功用于鉴定致病性与非致病性 *E. coli* 菌株间的基因差异,并且获取到致病性菌株的特异基因片段^[19]。目前,微生物生态的研究趋势是从结构向功能的转变,因此,RDA 技术也可用于新的功能基因的发掘。本研究 RDA 分析发现,分离自不同地区的猪源 *L. sobrius* 001^T 和 S1 菌株为相似菌株,这说明它们可能有相同的功能,即保障仔猪肠道健康,而且这种功能可能存在普遍性,因此,该菌可作为益生菌进一步用于动物在体研究。

本研究 RDA 分析发现一些较长的核酸片段(大于 1500bp)在 Driver 制备过程中没有得到充分富集,导致

在进行核酸杂交前有一些基因的遗漏,这提示限制性内切酶对菌株基因组 DNA 消化这一步骤也是非常重要的,应根据不同细菌核酸的碱基特性来选择合适的限制性内切酶。目前,该领域的研究才刚刚起步,特别在国内还未见相关报道,我们还需要从各方面对该技术进行优化。

参 考 文 献

- [1] Vaughan E, Mollet B, de Vos W. Functionality of probiotics and intestinal lactobacilli: light in the intestinal tract tunnel. *Curr Opin Biotechnol*, 1999, 10: 505-510.
- [2] Janczyk P, Pieper R, Smidt H, et al. Changes in the diversity of pig ileal lactobacilli around weaning determined by means of 16S rRNA gene amplification and denaturing gradient gel electrophoresis. *FEMS Microbiol Ecol*, 2007, 61: 132-140.
- [3] Konstantinov SR, Poznanski E, Fuentes S, et al. *Lactobacillus sobrius* sp. nov., a novel isolate abundant in the intestine of weaning piglets. *Int J Syst Evol Micr*, 2006, 56: 29-32.
- [4] 吴慧芬,毛胜勇,姚文,等.猪源乳酸菌产乳酸及其抑菌特性研究.微生物学通报(*Microbiology*), 2005, 1: 79-84.
- [5] Konstantinov SR, Awati AA, Williams BA, et al. Post-natal development of the porcine microbiota composition and activities. *Environ Microbiol*, 2006, 8: 1191-1199.
- [6] 姚文,朱伟云,毛胜勇.16S rDNA 技术研究新生腹泻仔猪粪样细菌区系的多样性变化.微生物学报(*Acta Microbiologica Sinica*), 2006, 46: 150-154.
- [7] Chatellier S, Harel J, Zhang Y, et al. Phylogenetic diversity of *Streptococcus suis* strains of various serotypes as revealed by 16S rRNA gene sequence comparison. *Int J Syst Bacteriol*, 1998, 48: 581-589.
- [8] Lisitsyn NA, Lisitsyn N, Wigler M. Cloning the differences between two complex genome. *Science*, 1993, 259: 946-951.
- [9] Middendorf B, Gross R. Representational difference analysis identifies a strain-specific LPS biosynthesis locus in *Bordetella* spp. *Mol Gen Genet*, 1999, 262: 189-198.
- [10] Felske A. Streamlined representational differences analysis for comprehensive studies of numerous genomes. *J Microbiol Meth*, 2002, 50: 305-311.
- [11] Konstantinov SR, Smidt H, de Vos WM. Representative difference analysis and real-time PCR for strain-specific quantification of *Lactobacillus sobrius* sp. nov. *Appl Environ Microbiol*, 2005, 71: 7578-7581.
- [12] Zoetendal EG, Akkermans ADL, De Vos WM. Temperature gradient gel electrophoresis analysis from human fecal samples reveals stable and host specific communities of active bacteria. *Appl Environ Microb*, 1998, 64: 3854-3859.
- [13] Nübel U, Engelen B, Felske A, et al. Sequence heterogeneities of

- genes encoding 16S rRNAs in *Paenibacillus polymyxa* detected by temperature gradient gel electrophoresis. *J Bacteriol*, 1996, 178: 5636–5643.
- [14] Muyzer G, de Waal EC, Uitterlinden AG. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction amplified genes encoding for 16S rRNA. *Appl Environ Microb*, 1993, 59: 695–700.
- [15] Lane DJ. 16S/23S rRNA sequencing. In: E. Stackebrandt and M. Goodfellow (ed.), *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. United Kingdom: John Wiley & Sons, Chichester, 1991, pp 115–175.
- [16] Heilig HG, Zoetendal EG, Vaughan EE, *et al.* Molecular diversity of *Lactobacillus* spp. and other lactic acid bacteria in the human intestine as determined by specific amplification of 16S ribosomal DNA. *Appl Environ Microbiol*, 2002, 68: 114–123.
- [17] 苏勇, 姚文, 朱伟云. 益生菌 *Lactobacillus amylovorus* S1 对仔猪后肠菌群的影响. *微生物学报 (Acta Microbiologica Sinica)*, 2006, 46: 961–966.
- [18] Stackebrandt E, Goebel BM. Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int J Syst Bacteriol*, 1994, 44: 846–849.
- [19] Janke B, Dobrindt U, Hacker J, *et al.* A subtractive hybridization analysis of genomic differences between the uropathogenic *E. coli* strain 536 and the *E. coli* K-12 strain MG1655. *FEMS Microbiol Lett*, 2001, 199: 61–66.

Comparison of two *Lactobacillus* strains isolated from piglets in different area by using representational difference analysis

Yong Su, Wen Yao, Weiyun Zhu*

(Laboratory of Gastrointestinal Microbiology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: [Objective] To identify *Lactobacillus* sp. strain S1 from the intestine of piglet, and compare the genomic difference between this strain and *Lactobacillus sobrius* 001^T. [Methods] Analysis of 16S rRNA gene sequence and species-specific polymerase chain reaction assay were used to identify *Lactobacillus* sp. strain S1. Representational difference analysis (RDA) was used to compare these two strains. [Results] The 16S rRNA gene sequence analysis of strain S1 showed that its closest known species in the GenBank database was *L. sobrius*. Denaturing gradient gel electrophoresis analysis showed that the predominant bands in profiles from bacteria in the jejunum and ileum of piglets had the identical migrating position with strain S1. Cloning and sequencing of 16S rRNA gene analysis revealed that this band matched clone (Clone S) was also related closely to *L. sobrius*. Phylogenetic analysis of 16S rRNA gene showed that homology between strain S1 and Clone S was 99.8%, and that between strain S1 and *L. sobrius* was 99.6%. Both strains could be detected in 1.2% agarose gel by *L. sobrius*-specific PCR assay. Recently, RDA has been adapted to study the genomic diversity of bacterial strains. This analysis showed that there was no genomic difference between the two strains. [Conclusion] Piglet-derived strain S1 belonged to *L. sobrius*. Piglet-derived *L. sobrius* 001^T and *L. sobrius* S1 were the similar strain.

Keywords: *Lactobacillus sobrius*; representational difference analysis; *Lactobacillus* sp. from piglet intestine

Supported by the Major Project of Chinese National Programs for Fundamental Research and Development (2004CB1175004) and the National Natural Science Foundation of China (30025034)

*Corresponding author. Tel: +86-25-84395523; E-mail: zhuweiyunnjau@hotmail.com

Received: 26 September 2007/ Revised: 25 January 2008