

利用种特异性寡核苷酸探针鉴定 5 种人源双歧杆菌的初步研究^{*}

张一凡¹ 冉 陆¹ 东秀珠²

(1. 卫生部食品卫生监督检验所,北京 100021; 2. 中国科学院微生物研究所,北京 100080)

摘 要:为了对 5 种常见于保健食品的双歧杆菌(长双歧杆菌、短双歧杆菌、青春双歧杆菌、婴儿双歧杆菌和两歧双歧杆菌)进行快速鉴定,在 16s rRNA 基因同源性分析的基础上,设计了 5 个种特异性寡核苷酸序列,对其 3'末端用地高辛标记后,作为探针与不同种的双歧杆菌 DNA 进行膜杂交。实验结果显示,这 5 个寡核苷酸探针除婴儿双歧杆菌种特异的探针 PIN-DIG 与短双歧杆菌有较弱的交叉反应外,其余均表现出较好特异性。说明这些 16s rRNA 基因探针对于食品中双歧杆菌的鉴定和检测是一个特异且有效的工具。

关键词:益生菌 寡核苷酸探针 种特异性 营养保健品

中图分类号:R15;TS218;Q7 **文献标识码:**A **文章编号:**1004-8456(2001)03-0003-05

双歧杆菌是人类肠道菌群的重要组成部分,与宿主的健康具有密切关系,近年来被广泛应用于功能食品,其中最常用的是分离自人的 5 种双歧杆菌。过去对双歧杆菌属内不同种的区分主要建立在表观特征基础上,如糖发酵类型和细胞形态学,^[1]但这些指标都会受一些培养条件的限制,从而会影响鉴定的准确性。另外,表观特征的鉴定要求培养过程和反应过程,较耗时。所以建立一种快速简便特异的鉴定方法十分必要。

由于 16s rRNA 序列是细菌系统发育研究及物种鉴定中一个十分重要的保守大分子,^[2~6]近年来,以 16s rRNA 基因为靶分子的 PCR 引物或杂交探针已用于很多细菌的快速鉴定。^[7~10]Matsuki 等^[11,12]共设计了 9 对 PCR 引物,用于检测双歧杆菌在人肠道中的分布。另外,Yamamoto 等^[10]设计了 5 种双歧杆菌的种特异性探针,以粗提的高分子量 RNA 为靶分子,显示了较好的特异性。但由于 RNA 易降解,给此方法带来了一定的不便。最近 Dong 等^[13]设计了在食品工业和微生态制剂中常用的 5 种双歧杆菌的种特异性 PCR 引物,这些引物分别对应于 16s rRNA 基因上的不同位置。当用这个引物的混合物和一个属特异性引物 Im3^[9]对未知 DNA 进行 PCR 扩增后,根据 PCR 产物的大小可对 5 种双歧杆菌进行快速鉴定。

本研究利用了 5 种双歧杆菌的种特异性 PCR 引物,^[13]用地高辛标记为寡核苷酸探针,与待测双歧杆菌的 DNA 在硝酸纤维素膜上进行斑点印迹杂交。结果显示 5 种探针均有较好的特异性,是进行种的快速鉴定的有用工具之一。

1 材料与方法

1.1 材料

菌株 来源 Japan Collection of Microorganisms (JCM)

长双歧杆菌 (*Bifidobacterium longum*) JCM1217^T

短双歧杆菌 (*Bifidobacterium breve*) JCM1192^T

婴儿双歧杆菌 (*Bifidobacterium infantis*) JCM1222^T

青春双歧杆菌 (*Bifidobacterium adolescentis*) JCM1275^T

两歧双歧杆菌 (*Bifidobacterium bifidum*) JCM1255^T

培养基

TPYG 培养基 胰酶 0.5 g,大豆蛋白胨 0.5 g,酵母提取物 1.0 g,葡萄糖 1.0 g,吐温 80 0.1 mL,0.1%刃天青 0.1 mL,琼脂 1.5 g,半胱氨酸-盐酸 0.05 g,盐溶液 4.0 mL,蒸馏水 100 mL,pH 6.8~7.0。盐溶液的配制见参考文献。^[14]

培养基装于螺口玻璃管中,用丁酰橡胶塞作为管盖,抽出空气,充入氮气,重复 5~6 次,预还原的培养基于 8 磅 30 min 高压灭菌。

主要试剂

地高辛寡核苷酸 3'末端标记试剂盒(Boehringer

^{*} 国家自然科学基金 39770001 资助项目

Mannheim,德国)
地高辛结合抗体(Boehringer Mannheim,德国)
显色剂 NBT,BCIP(华美生物制品公司,洛阳)
硝酸纤维素膜(鼎国生物制品公司,北京)

1.2 方法

细菌的培养与收集 将纯菌种转入预还原的TPYG厌氧液体培养基中,37 培养至对数生长期,注射青霉素 0.5 mg/mL,再培养 16~24 h,离心,收集菌体。

DNA 的提取 按文献^[15]的方法进行。

种特异性寡核苷酸探针的设计和标记 33 种双歧杆菌的 16s rRNA 序列可从 GenBank 获得。利用 ClustalW 软件对这些序列进行同源比较,找出 5 种双歧杆菌的种特异性 16s rRNA 基因序列,合成(六合通公司,北京)长约 20 bp 的寡核苷酸片段。

合成的寡核苷酸采用 Boehringer Mannheim 公司提供的地高辛寡核苷酸 3 末端标记试剂盒标记为探针(表 1),同时标定探针的浓度。

表 1 本实验所用寡核苷酸探针

探针	序列	在 16s rDNA 上的结合位点	靶菌株
PBI245	GCTTGTGGTGAAGTAAACGGCT	245~266	<i>B. bifidum</i>
PBR442	AGGGAGCAAGGCATTGTGT	442~462	<i>B. breve</i>
PIN710	CTGTTACTGACGCTGAGGAGCT	710~731	<i>B. infantis</i>
PAD805	GTGGGGACCATITCCACGGTC	805~824	<i>B. adolescentis</i>
PL0965	TCCCACGGTCGTAGAGATAC	965~985	<i>B. longum</i>

膜杂交 硝酸纤维素(NC)膜在 ddH₂O 中浸湿,晾干后再放入 20 ×SSC (3M NaCl,300 mM 枸橼酸钠,pH7.0),干燥后点样,将不同浓度的变性靶 DNA 点在膜上。将点样后的 NC 膜放入 80 烘箱 2 h,以固定 DNA。之后将膜浸入 5 ×SSC 中 2 min,预杂交 2 h(预杂交液 10 mL:5 ×SSC 8.89 mL,1 % blocking reagent 1 mL,0.1 % N-Laurolysarcosine 0.1 mL,0.02 % SDS 0.01 mL);相同温度下杂交 4 h;杂交后膜的漂洗和显色按试剂盒说明进行操作。

模板 DNA 浓度的测定 分光光度计法测 DNA 浓度,A₂₆₀ = 1 时,双链 DNA 浓度为 50 μg/mL。

2 结果 采用 DIG 标记的双歧杆菌种特异性的 16s rRNA 寡核苷酸探针,对 5 种常用于保健食品中的双歧杆菌:长双歧杆菌、短双歧杆菌、青春双歧杆菌、婴儿双歧杆菌和两歧双歧杆菌进行膜杂交。所有杂交反应的探针终浓度为 10 pmol/mL。

2.1 寡核苷酸探针的特异性 图 1~5 分别为 5 种探针(短双歧杆菌 PBR-DIG、婴儿双歧杆菌 PIN-DIG、两歧双歧杆菌 PBF-DIG、长双歧杆菌 PLO-DIG、青春双歧杆菌 PAD-DIG)与 5 种双歧杆菌的杂交结果,图

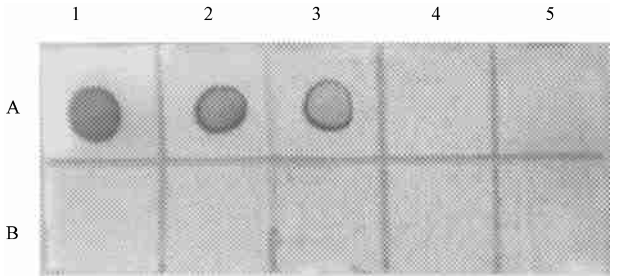


图 1 短双歧杆菌探针 PBR-DIG

同 5 种人源双歧杆菌 DNA 的点杂交(53)

A1~5 不同浓度短双歧杆菌 DNA:127 μg/mL,63.5 μg/mL,12.7 μg/mL,1.27 μg/mL,0.127 μg/mL。
B1~5 两歧双歧杆菌 DNA(40 μg/mL),长双歧杆菌 DNA(37 μg/mL),婴儿双歧杆菌 DNA(93 μg/mL),青春双歧杆菌 DNA(40 μg/mL),去离子水。

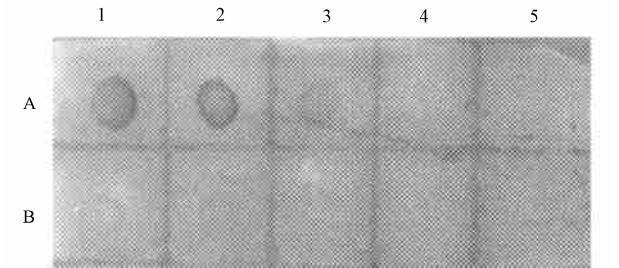


图 2 婴儿双歧杆菌探针 PIN-DIG

同 5 种人源双歧杆菌 DNA 的点杂交(55.5)

A1~5 不同浓度婴儿双歧杆菌 DNA:93 μg/mL,46.5 μg/mL,9.3 μg/mL,0.93 μg/mL,0.093 μg/mL。
B1~5 短双歧杆菌 DNA(127 μg/mL),长双歧杆菌 DNA(37 μg/mL),两歧双歧杆菌 DNA(40 μg/mL),青春双歧杆菌 DNA(40 μg/mL),去离子水。

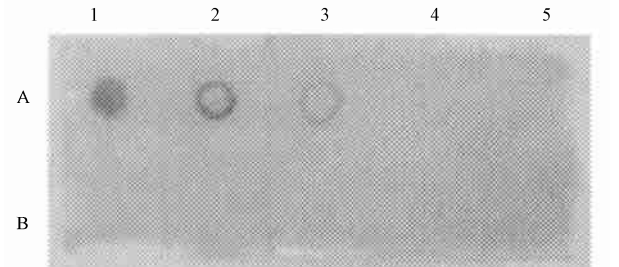


图 3 两歧双歧杆菌探针 PBF-DIG

同 5 种人源双歧杆菌 DNA 的点杂交(54.5)

A1~5 不同浓度两歧双歧杆菌 DNA:40 μg/mL,20 μg/mL,4 μg/mL,0.4 μg/mL,0.04 μg/mL。
B1~5 短双歧杆菌 DNA(127 μg/mL),长双歧杆菌 DNA(37 μg/mL),婴儿双歧杆菌 DNA(93 μg/mL),青春双歧杆菌 DNA(40 μg/mL),去离子水。

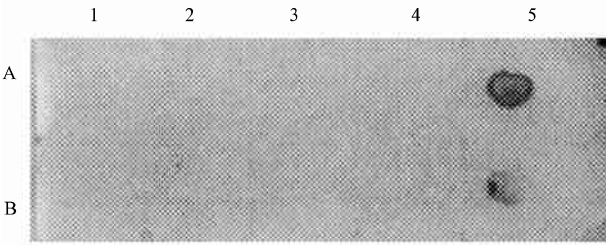


图4 长双歧杆菌探针 PLO-DIG

同5种人源双歧杆菌DNA的点杂交(55℃)

A1~5 两歧双歧杆菌 DNA(40 μg/mL),短双歧杆菌(127 μg/mL), 婴儿双歧杆菌 DNA(93 μg/mL),青春双歧杆菌 DNA(40 μg/mL), 长双歧杆菌 DNA(37 μg/mL)。
B1~5 两歧双歧杆菌 DNA(4 μg/mL),短双歧杆菌(12.7 μg/mL), 婴儿双歧杆菌 DNA(9.3 μg/mL),青春双歧杆菌 DNA(4 μg/mL), 长双歧杆菌 DNA(3.7 μg/mL)。

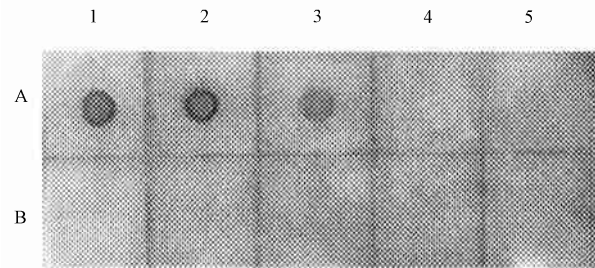


图5 青春双歧杆菌探针 PAD-DIG

同5种人源双歧杆菌DNA的点杂交(55℃)

A1~5 不同浓度青春双歧杆菌 DNA:40 μg/mL,20 μg/mL,4 μg/mL,0.4 μg/mL,0.04 μg/mL。
B1~5 短双歧杆菌 DNA(127 μg/mL),长双歧杆菌 DNA(37 μg/mL),婴儿双歧杆菌 DNA(93 μg/mL),两歧双歧杆菌 DNA(40 μg/mL),去离子水。

中不仅显示了每种探针的特异性,同时还显示出了探针与模板DNA不同浓度梯度的反应强度。在5种探针中,PLO-DIG、PBR-DIG、PBF-DIG、PAD-DIG的特异性均很好,而PIN-DIG与短双歧杆菌有交叉反应,或许是因为该探针的碱基序列与短双歧杆菌相同位置的互补碱基差异极小。

同时还测定了PBR-DIG、PBF-DIG、PAD-DIG与所有的双歧杆菌33个种及其他乳酸菌的杂交结果。由表2可见,3种探针均表现了较好的特异性,只有PAD-DIG与非人源的双歧杆菌(纤细双歧杆菌)有交叉反应,但由于该菌不会应用在人用保健食品中,所以将不会影响此探针用于食品中双歧杆菌的检测。

2.2 DNA 浓度 为测定能产生明显杂交斑的模板DNA浓度,在与长双歧杆菌探针 PLO-DIG 的杂交膜上分别点2个稀释度的长双歧杆菌DNA,而在与其他4种探针的杂交膜上分别点5个稀释度的DNA,

并用另外4种变性DNA和去离子水作为对照分别点1个稀释度。结果表明,能与 PLO-DIG 产生明显杂交斑的最低模板DNA浓度为37 μg/mL,而与PBR-DIG、PIN-DIG、PAD-DIG、PBF-DIG杂交的最低模板DNA浓度分别为12.7 μg/mL、46.5 μg/mL、20 μg/mL、

表2 3种探针与33种双歧杆菌的杂交结果

菌种名称	16s rRNA 基因序列号	探 针		
		PBR-DIG	PBF-DIG	PAD-DIG
<i>B. bifidum</i> JCM1255	S83624	-	+	-
<i>B. longum</i> JCM1217	M58739	-	-	-
<i>B. infantis</i> JCM1222	X70974	-	-	-
<i>B. infantis</i> JCM1210	Δ	-	-	-
<i>B. breve</i> JCM1192	M58731	+	-	-
<i>B. adolescentis</i> JCM1275	M58744	-	-	+
<i>B. angulatum</i> JCM7096	D86182	-	-	-
<i>B. catenulatum</i> JCM1194	M58732	-	-	-
<i>B. pseudocatenulatum</i> JCM1200	D86187	-	-	-
<i>B. dentium</i> JCM1195	M58735	-	-	-
<i>B. pseudolongum</i> ssp. <i>globosum</i> JCM5820	M58736	-	-	-
<i>B. pseudolongum</i> ssp. <i>pseudolongum</i> JCM1205	M58742	-	-	-
<i>B. cuniculi</i> JCM1213	M58734	-	-	-
<i>B. choerinum</i> JCM1212	D86186	-	-	-
<i>B. thermophilum</i> JCM1207	U10151	-	-	-
<i>B. boum</i> JCM1211	D86190	-	-	-
<i>B. animalis</i> JCM1190	X70971	-	-	-
<i>B. magnum</i> JCM1218	M58740	-	-	-
<i>B. pullorum</i> JCM1214	D86196	-	-	-
<i>B. suis</i> JCM1269	M58743	-	-	-
<i>B. minimum</i> JCM5821	M58741	-	-	-
<i>B. subtile</i> JCM5822	D89379	-	-	+
<i>B. asteroides</i> JCM8230	M58730	-	-	-
<i>B. coryneforme</i> JCM5819	M58733	-	-	-
<i>B. indicum</i> JCM1302	D86188	-	-	-
<i>B. inopinatum</i> DSM10107	ABO29087	-	-	-
<i>B. denticolens</i> DSM10105	D89331	-	-	-
<i>B. saeculare</i> JCM8223	D89328	-	-	-
<i>B. merycicum</i> JCM8219	D86192	-	-	-
<i>B. ruminantium</i> JCM8222	D86197	-	-	-
<i>B. lactis</i> DSM10140	X89513	-	-	-
<i>B. gallicum</i> JCM8224	D86169	-	-	-
<i>B. gallinarum</i> JCM6921	D86191	-	-	-
<i>B. thermacidophilum</i> AS. 1. 1882	ABO16246	-	-	-
<i>C. butyricum</i>	Δ	-	-	-

注:Δ 目前该16s rDNA序列还未测定

20 µg/mL。因此,用普通的 DNA 提取法便能得到充足的反应 DNA。

2.3 杂交温度 对于寡核苷酸探针而言,杂交温度主要与探针的碱基组成有关,按下式进行计算:

$T() = [(G + C) \times 4 + (A + T) \times 2] - 5$ 。在此温度范围附近的几个不同温度下进行探针杂交,确定最佳杂交温度。5 个探针的杂交温度范围是 53 ~ 55.5,每个探针的实际杂交温度见图 1 ~ 5 的图示。

3 讨论

双歧杆菌属内种的 16s rRNA 序列的同源性大于 93%,^[16]通过分析序列中的碱基差异,合成种特异性的寡核苷酸探针,与待测菌株 DNA 进行杂交,再结合表型特征,将会使鉴定结果更准确。Wallace 等^[17]的实验表明,即使在序列上只有一个碱基差异的寡核苷酸,也可作为序列特异的探针。16s rRNA 由于具有高度保守性而成为物种在探索基因水平鉴定的主要靶分子。近年已有多个利用 16s rRNA 基因的寡核苷酸探针鉴定未知细菌的报道,^[18~20]其中 Kaufmann 等^[9]设计的属特异性 PCR 引物 Im26 被标记为探针用于本实验中双歧杆菌属的鉴定。本文根据 Genbank 中双歧杆菌属 33 个种的 16s rRNA 基因序列,设计和合成了 5 种常用人源双歧杆菌的种特异性寡核苷酸探针,其长度为 20 ~ 22 bp,膜杂交结果表明,每种探针均有较好的特异性。

但在完成该实验的过程中,我们也发现,虽然在鉴定 5 种常用的人源双歧杆菌方面,五种探针均表现了较好的特异性,但青春双歧杆菌的探针 PAD-DIG 与非人源的双歧杆菌有部分交叉反应,所以在实际应用中,只有在确定了菌种来源后,才能应用此方法。另外,本实验中所用 DNA 采用的是较复杂的传统提取法,比较耗时。为了简化提取步骤,应摸索快速简便的提取法,才更有利于推广。同时,还应建立用于菌落杂交的实验方法,不但可以省去提 DNA 这一步骤,还可以对试样进行菌落计数。更重要的是,在对未知菌种鉴定之前,必须确定所设计的探针确实具有特异性,否则一切工作都是徒劳。这就要求在设计探针时,一定要全面分析所有种的 16s rRNA 序列,找出确实能反应其特异性的片段,使实验误差达到最小。从这种意义上讲,分子生物学方法不可能完全取代表型特征鉴定方法,而只能是将二者结合起来,从而使鉴定结果更准确。

近年来核酸探针杂交技术用于微生物的检测、

鉴定和定量得到了广泛应用和飞速发展,再加上越来越多的细菌 16s rRNA 基因全部或部分序列的获得,为寡核苷酸探针的设计提供了更加便利的条件,从而为从环境中分离出的双歧杆菌做出快速鉴定和定量研究提供了更加可靠的科学依据。关于细菌基因水平的知识了解得越多,我们对未知领域的细菌就会探索得越深入;而基于分子水平上的检测手段发展得越完善,我们对已知领域的细菌,尤其是难培养细菌的鉴定,就更能反映其在原始生境中的自然分布和生长状态。

参考文献:

- [1] Scardovi V. Bergey's manual of systematic bacteriology (2) [M]. Baltimore: The Williams & Wilkins Co., 1986, 1418—1434.
- [2] David M. Ward Roland Weller, Mary M. Bateson 16s rRNA sequences reveal numerous uncultured microorganisms in a natural community[J]. Nature. 1990, 345 (3): 63—65.
- [3] Stackebrandt E, O. Chai Freitag. Partial 16s rRNA primary structure of five Actinomyces species: phylogenetic implications and development of an Actinomyces israelii-specific oligonucleotide probe[J]. J Gen Microbiol, 1990, 136: 37—43.
- [4] Morotomi M, S. Hoshina, P. Green, et al. Oligonucleotide probe for detection and identification of Campylobacter pylori[J]. J Clin Microbiol, 1989, 27: 2652—2655.
- [5] Salama M, W. Sandine, S. Giovannoni. Development and application of oligonucleotide probes for identification of Lactococcus lactis subsp. Cremoris[J]. Appl Environ Microbiol, 1991, 57: 1313—1318.
- [6] Wilson K H, R. Blitchington, B. Hindenach, et al. Species-specific oligonucleotide probes for rRNA of Clostridium difficile and related species[J]. J Clin Microbiol, 1988, 26: 2484—2488.
- [7] Wang R F, Cao W W, Cerniglia C E. PCR detection and quantitation of predominant anaerobic bacteria in human and animal fecal samples [J]. Appl Environ Microbiol, 1996, 62: 1242—1247.
- [8] Kok R G, Waal A D, Schut F, et al. Specific detection and analysis of a probiotic bifidobacterium strain in infant feces [J]. Appl Environ Microbiol, 1996, 62: 3668—3672.
- [9] Peter Kaufmann, Anita Pfefferkorn, Michael Teuber, et al. Identification and quantification of bifidobacterium species isolated from food with genus-specific 16s rRNA-targeted probes by colony hybridization and PCR[J]. Appl Environ Microbiol, 1997, 63 (4): 1268—1273.
- [10] Takaharu Yamamoto, Masami Morotom, Ryuichiro Tanaka. Species-specific oligonucleotide probes for five bifidobacterium species detected in human intestinal microflora[J]. Appl

- Environ Microbiol ,1992 ,58(12) :4076 —4079.
- [11] Matsuki T ,Watanabe K ,Tanaka R ,et al . Rapid identification of human intestinal bifidobacteria by 16s rRNA-targeted species and group group-specific primers [J] . FEMS Microbiol Lett ,1998 ,167 :113 —121.
- [12] Matsuki T ,Watanabe K ,Tanaka R ,et al . Distribution of bifidobacterial species in human intestinal microflora examined with 16s rRNA-gene-targeted species-specific primers [J] . Appl Environ Microbiol ,1999 ,65 :4506 —4512.
- [13] Xiuzhu Dong , Gang Cheng , Wenying Jian . Simultaneous identification of five bifidobacterium species isolated from human beings using multiple PCR primers [J] . Syst Appl Microbiol ,2000 ,23(3) :386 —390.
- [14] 凌代文 . 乳酸细菌分类及鉴定方法 [M] . 北京 :中国轻工业出版社 ,1990.
- [15] Mamur J . A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms [J] . J Mol Biol ,1961 ,3 :208 —218.
- [16] Leblong-Bourget N ,H Philippe ,I Mangin ,et al . 16s rRNA and 16s to 23s internal transcribed spacer sequence analyses reveal inter and intraspecific bifidobacterium phylogeny [J] . Int J Syst Bacteriol ,1996 ,46 :102 —111.
- [17] Wallace R B ,J Shaffer ,R F Murphy ,et al . Hybridization of synthetic oligodeoxynucleotides to Φ x174DNA :the effect of a single base pair mismatch [J] . Nucleic Acids Res ,1979 ,6 :3543 —3557.
- [18] Stephen J Giovannoni ,Edward F Delong ,Gary J Olsen ,et al . Phylogenetic group-specific oligodeoxynucleotide probes for identification of single microbial cells [J] . J Bacteriol ,1988 ,170(2) :720 —726.
- [19] Maysoon Salama ,William Sandine ,Stephen Giovannoni . Development and application of oligonucleotide probes for identification of *Lactococcus lactis* subsp. *Cremoris* [J] . Appl Environ Microbiol ,1991 ,57(5) :1313 —1318.
- [20] Boris Zarda ,Rudolf Amann ,Gunter Wallner ,et al . Identification of single bacterial cells using digoxigenin-labeled , rRNA-targeted oligonucleotides [J] . J Gen Microbiol ,1991 ,137 :2823 —2830.

Tentative study on species-specific oligonucleotide probes for identification of five Bifidobacteria from human being /Zhang Yifan ,Ran Lu ,Dong Xiuzhu //Chinese Journal of Food Hygiene . 2001 ,13(3) :3 ~ 7

Abstract: For rapidly identifying 5 bifidobacterium species (*B. longum* , *B. breve* , *B. adolescentis* , *B. infantis* and *B. bifidum*) often used in functional food ,we designed five species-specific oligonucleotide sequences ,which were based on the homology analysis of 16s rRNA genes . After being labeled with digoxigenin (DIG) at 3'-end ,the sequences were used as probes hybridizing with DNA from these 5 bifidobacteria . These probes showed the desired species specificity ,except that the probe for *B. infantis* had weak cross-reaction with *B. breve* . The result showed that these 16s rRNA gene probes were specific and effective tools for identifying and detecting Bifidobacteria in food .

Author's address: Zhang Yifan ,the Institute of Food Safety Control and Inspection ,Ministry of the Health ,100021 PRC .

Key Words: Probiotics Oligonucleotide probes species-specificity Dietary Supplements

本 刊 通 告

本刊电话变更为 010 - 87781383 ,原电话取消。

《中国食品卫生杂志》编辑部