

文章编号:1673-1689(2009)06-0804-07

16S rDNA-RFLP 技术鉴定西藏地区 乳制品中的乳杆菌

于洁, 孙志宏, 张家超, 艾日登才次克, 张彦斌,
杨梅, 孙天松, 张和平*

(内蒙古农业大学 乳品生物技术与工程教育部重点实验室, 内蒙古 呼和浩特 010018)

摘要: 将 16S rDNA PCR 技术和 RFLP 技术相结合, 对分离自乳制品中的乳杆菌进行分类和鉴定。从我国西藏地区传统发酵乳中分离出 51 株乳杆菌, 采用通用引物扩增 16S rDNA, 利用限制性内切酶 *AluI*, *HaeIII* 和 *HinfI* 将 16S rDNA 扩增产物进行酶切后, 经聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱将菌种鉴定到种的水平。根据 16S rDNA-RFLP 的结果从中选出 8 株有代表性的菌株进行生理生化实验和 16S rDNA 序列的测定, 实验结果与 RFLP 鉴定结果相吻合, 表明此方法是一种快速、准确的可用于大量乳杆菌分类和鉴定的方法。

关键词: 乳杆菌; 鉴定; 限制性片段长度多态性(RFLP); 16S rDNA 序列
中图分类号: TS 252.1 文献标识码: A

Identification of *Lactobacillus* Isolated from Home-Made Fermented Milk in Tibet by 16S rDNA-RFLP

YU Jie, SUN Zhi-hong, ZHANG Jia-chao, Airidengcaিকে, ZHANG Yan-bin,
YANG Mei, SUN Tian-song, ZHANG He-ping*

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

Abstract: In this study, *Lactobacilli* were rapidly classified and identified by the combinational method of 16S rDNA PCR and Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP). Fifty one strains of *Lactobacillus* were isolated from traditional homemade fermented milk in Tibet, China. The 16S rDNA of all isolates were amplified by universal primers, and amplification productions were digested using a set of restriction enzymes, *AluI*, *HaeIII* and *HinfI*. Polyacrylamide gel electrophoregram analysis indicated that the *lactobacilli* could be clearly identified at the species level. Further studies on 16S rDNA sequences, physiological and biochemical test of 8 different strains showed that 16S rDNA PCR-RFLP analysis is rapid and easy way to identify large scale of *Lactobacillus*.

Key words: *Lactobacillus*, identification, restriction fragment length polymorphism (RFLP), 16S rDNA sequence

收稿日期: 2009-02-16

基金项目: 国家自然科学基金项目(30660135, 30800861); 国家 863 计划项目(2006AA10Z345, 2007AA10Z353); 教育部新世纪优秀人才支持计划项目(NCET-06-0269)。

* 通讯作者: 张和平(1965-), 男, 内蒙古呼和浩特人, 工学博士, 教授, 博士生导师, 主要从事乳品生物技术方面的研究。
Email: hepingdd@vip.sina.com

乳杆菌属(*Lactobacillus*)是乳酸菌类群中最大的一个属,一般呈细长的杆状,大多为链状排列。它们均为革兰氏阳性无芽孢菌,微需氧,并广泛分布于人体、动物、植物和整个自然界。乳杆菌是肠道正常微生物体系中的重要成员并与宿主终生相伴,通过重建肠道菌群平衡,从而有利于人类及某些动物宿主恢复并提高健康状态^[1]。

乳杆菌属中的大多数菌种也是工业上尤其是食品工业中的常用菌种。由于其作为重要的工业微生物,具有不可取代的优先研发地位,所以对乳酸菌进行快速、可靠的分类和鉴定在微生物学和食品科学的研究中是必需的。传统的细菌鉴定方法费时费力,不适合于大量细菌的鉴定和分类以及种群多样性研究。近年来,随着生物化学和分子生物学的发展,一些新的分子生物学技术,如 PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) 技术、T-RFLP 分析等分子分类方法为我们提供了极大的方便^[2]。16S rDNA 以其高度保守性,高信息量及与大多数生理、遗传标记一致,而成为群落系统发育分析中使用最广泛的分子标记物,其 RFLP 分析能够较好地反映出属、种和亲缘关系较近的菌株间的差异^[3]。

作者对采自西藏地区传统发酵黄牛奶和牦牛奶中分离出的 51 株乳杆菌,采用 16S rDNA PCR-RFLP 技术将其直接鉴定到种的水平,从中选取部分代表菌株进行传统生理生化实验和测定 16S rDNA 序列来验证此方法的可靠性,从而为乳酸菌菌种多样性的鉴定提供一种简便、准确的途径。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 样品来源 6 份发酵黄牛乳和 6 份发酵牦牛乳样品均采自西藏江孜县、当雄县和那曲县等不同地区采用传统工艺酿造酸牛奶的藏族家庭。

1.1.2 菌株来源 试验所用菌株为样品中分离出的 51 株乳杆菌。参考菌株 *Lactobacillus casei* AS1. 2435、*Lactobacillus helveticus* AS1. 2278、*Lactobacillus plantarum* AS1. 2437、*Lactobacillus rhamnosus* AS1. 2134、*Lactobacillus acidophilus* AS1. 1878、*Lactobacillus fermentum* AS1. 1880、*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii* AS1. 2624、*Lactobacillus animalis* AS1. 2623、*Lactobacillus coryniformis* subsp. *coryniformis* AS1. 1879; 购于中国普通微生物菌种保藏管理中心 (CGMCC)。

1.1.3 试剂和仪器 MJ PTC 200 梯度基因扩增仪, UVP CDS8000 凝胶成像分析系统, Taq DNA 聚合酶、限制性内切酶等购自宝生物工程有限公司 (TaKaRa)。

1.2 乳酸菌全基因组的提取

采用 CTAB 法和冻融法^[4-5]相结合的方法来提取乳杆菌的基因组 DNA。取适量供试菌株的菌体于 1.5 mL 离心管中,加入 500 μ L TE 缓冲液(10 mmol/L TrisCl, 1 mmol/L EDTA, pH 8.0)充分振荡均匀后置于液氮中冻结(约 5 min),取出迅速放入 65 $^{\circ}$ C 水浴 5 min,使其充分融化,重复冻融步骤 4 次后加入 60 μ L SDS(10%) 和 10 μ L 蛋白酶 K(20 mg/mL),置于 55 $^{\circ}$ C 水浴锅中进行消化;1 h 后取出加入 100 μ L NaCl (5 mol/L) 和 80 μ L CTAB/NaCl 溶液(10% CTAB, 0.7 mol/L NaCl)混匀后 65 $^{\circ}$ C 水浴 15 min; 然后用苯酚-氯仿-异戊醇(体积比 25:24:1)混合溶液抽提 2 次去蛋白质,澄清的上清液加等体积预冷的异丙醇和 0.1 倍体积的 3 mol/L NaAc 沉淀 DNA, 12 000 r/min 离心 3 min, 去除上清液并用 70% 的乙醇洗涤两次;自然风干后溶于适量的 TE 缓冲液中贮存于 -20 $^{\circ}$ C 备用。

1.3 乳酸菌 16S rDNA 的扩增

16S rDNA 扩增引物采用通用引物^[6-7],正向引物为 27f(对应于 *Escherichia coli* 8-27 位碱基): 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTC AG-3'; 反向引物为 1495r(对应于 *Escherichia coli* 1495-1515 位碱基): 5'-CTACGGCTACCTTGTACGA-3', 由上海桑尼生物科技有限公司合成。PCR 扩增片段约为 1450 bp。采用 25 μ L 反应体系进行 PCR 扩增, 扩增条件:94 $^{\circ}$ C 5 min 预变性; 94 $^{\circ}$ C 1 min, 58 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 2 min, 30 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。取 2 μ L 产物用 0.1 g/dL 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.4 RFLP 分析

1.4.1 限制性内切酶的选择 在核糖体数据库 (Ribosomal Database Project, <https://rdp.cme.msu.edu/>) 搜索并下载所有公布的 16S rDNA 序列,通过 NEBcutter V2.0^[8] 软件 (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php>), 分别对已知序列菌株的 16S rDNA 进行酶切,并用 1.4 g/dL 的琼脂糖凝胶进行模拟电泳。通过对电泳图谱的分析初步选出 6 种适合乳酸菌的核酸内切酶, *Hae* III、*Taq* I、*Msp* I、*Hind* III、*Hinf* I 和 *Alu* I, 酶的识别序列和酶切位点是:*Hinf* I: 5'-G/ANTC-3'; *Hae* III: 5'-GG/CC-3'; *Msp* I: 5'-C/CGG-3'; *Hind* III: A/AGCTT; *Alu* I: AG/CT; *Taq* I:

T/CGA。

1.4.2 16S rDNA 扩增片段的限制性酶切分析

分别用6种限制性内切酶对16S rDNA的扩增产物进行酶切。酶切反应总体积为20 μL,含2 μL PCR反应产物,2 U的内切酶和2 μL的10×反应缓冲液。在酶的最适温度下水浴3 h后,取4 μL酶切产物在5 g/dL的聚丙烯酰胺凝胶上150 V电压进行电泳,银染后扫描图片。

1.5 生理生化鉴定

根据RFLP结果挑出8株有代表性的菌,按文献[9-10]进行生理生化试验、糖发酵试验,乳酸旋光性测定采用试剂盒,细胞壁中DAP测定参照文献[9]进行。

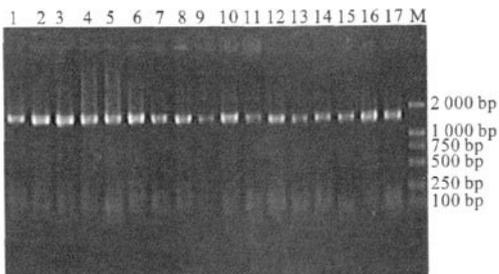
1.6 16S rDNA 序列测序和构建系统发育树

将选出有代表性8株菌的16S rDNA扩增产物送上海桑尼生物技术有限公司测序。测定的序列用BLAST在GenBank中搜索相近序列(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/)。将测序菌株与标准菌株的16S rDNA序列首先使用ClustalX^[11]将序列进行完全比对,然后用Neighbor-joining法^[12]取得序列的进化距离。使用MEGA 4软件^[13]作出系统进化树,数据自展重抽样次数1 000次。

2 结果与分析

2.1 16S rDNA 的扩增检测

所有供试菌株均获得PCR产物,扩增产物经1.0 g/dL的琼脂糖凝胶电泳检测,在约1500 bp处出现荧光条带,见图1。

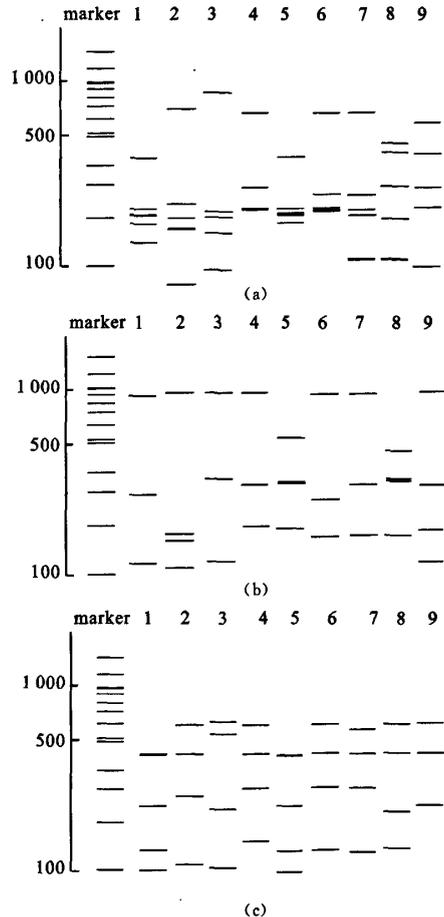


1: IMAU60027, 2: IMAU60018, 3: IMAU60116, 4: IMAU60109, 5: IMAU60042, 6: IMAU60026, 7: IMAU60125, 8: IMAU60078, 9: Lactobacillus acidophilus AS1. 1878, 10: Lactobacillus delbrueckii subsp. delbrueckii AS1. 2624, 11: Lactobacillus coryniformis subsp. coryniformis AS1. 1879, 12: Lactobacillus rhamnosus AS1. 2134, 13: Lactobacillus helveticus AS1. 2278, 14: Lactobacillus casei AS1. 2435, 15: Lactobacillus plantarum AS1. 2437, 16: Lactobacillus fermentum AS1. 1880, 17: Lactobacillus animalis AS1. 2623, M: DL 2000 DNA Marker

图1 16S rDNA 的PCR扩增产物电泳图
Fig.1 Amplification productions of 16S rDNA

2.2 限制性内切酶的选取结果

采用NEBcutter V2.0软件初步选出的6种限制性内切酶Hae III、Taq I、Msp I、Hind III、Hinf I和Alu I,模拟电泳图谱表明,Hae III、Hinf I和Alu I较适用于乳杆菌的鉴定,见图2。由于Taq I、Msp I和Hind III酶切位点太多或菌株间无明显差异而未应用。



1: Lactobacillus acidophilus AS1. 1878, 2: Lactobacillus delbrueckii subsp. delbrueckii AS1. 2624, 3: Lactobacillus coryniformis subsp. coryniformis AS1. 1879, 4: Lactobacillus rhamnosus AS1. 2134, 5: Lactobacillus helveticus AS1. 2278, 6: Lactobacillus casei AS1. 2435, 7: Lactobacillus plantarum AS1. 2437, 8: Lactobacillus fermentum AS1. 1880, 9: Lactobacillus animalis AS1. 2623, Marker: 100 bp DNA ladder

图2 9株参考菌株16S rDNA的Hinf I、Hae III、Alu I模拟限制性酶切图谱

Fig.2 The analogical 16S rDNA RFLP patterns of nine control strains digested with AluI (a), HinfI (b) and HaeIII(c)

2.3 16S rDNA 限制性酶切结果

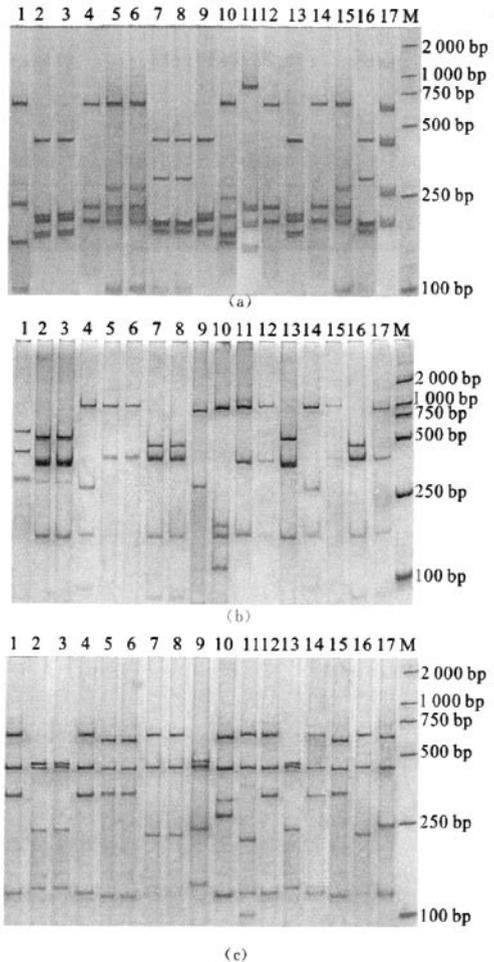
利用限制性内切酶Hae III、Hinf I和Alu I分别对51株乳杆菌和9株参考菌株的16S rDNA片

段进行酶切,聚丙烯酰胺凝胶电泳后将参考菌株的实际电泳图谱与模拟电泳图谱相比,相同菌株的主要带型相同,只有少数条带由于实际电泳的分辨率小而丢失,说明扩增和酶切效果均很好,再比较待测菌株和参考菌株的条带类型将其鉴定到种的水平。

由限制性核酸内切酶 *Alu I* 酶切聚丙烯酰胺凝胶电泳图(图 3a)可知,待测菌株 IMAU60018、IMAU60116 与参考菌株 *Lactobacillus helveticus*、*Lactobacillus acidophilus* 的带型一致; IMAU60042、IMAU60026 只与 *Lactobacillus plantarum* 相同,所以初步将其归为 *Lactobacillus plantarum*。IMAU60109、IMAU60027 与参考菌株 *Lactobacillus rhamnosus* 和 *Lactobacillus casei* 的带型特别相似,所以可判定 IMAU60109、IMAU60027 为其中的一种菌。IMAU60125 和 IMAU60078 带型与 *Lactobacillus fermentum* 相似,初步鉴定其为 *Lactobacillus fermentum*。从限制性核酸内切酶 *Hinf I* 酶切聚丙烯酰胺凝胶电泳图(图 3b)可以看出,IMAU60027 通过 *Hinf I* 后与 *Lactobacillus rhamnosus* 和 *Lactobacillus casei* 带型均不一致,且与所有的参考菌株都不同,所以此菌需进一步鉴定; IMAU60018、IMAU60116 与参考菌株 *Lactobacillus helveticus* 的带型一致,且与 *Lactobacillus acidophilus* 的带型差异很大,故可判定其为 *Lactobacillus helveticus*; IMAU60109 的带型只与 *Lactobacillus casei* 相同,而且和 *Lactobacillus rhamnosus* 的带型有差异,所以将其初步鉴定为 *Lactobacillus casei*。IMAU60042、IMAU60026 与 *Lactobacillus coryniformis* subsp. *coryniformis*、*Lactobacillus rhamnosus*、*Lactobacillus plantarum*、*Lactobacillus animalis* 的带型均很相近,但是 *Alu I* 酶切图谱显示 IMAU60042、IMAU60026 只与 *Lactobacillus plantarum* 一致,所以初步鉴定其为 *Lactobacillus plantarum*; IMAU60125 和 IMAU60078 带型与 *Lactobacillus fermentum* 一致,这与 *Alu I* 酶切图谱鉴定结果相同,所以确定其为 *Lactobacillus fermentum*。

2 种酶切图谱已经初步将乳杆菌鉴定到种的水平,采用第 3 种限制性核酸内切酶 *Hae III* 的酶切图谱(图 3c)可以进一步验证菌株的鉴定结果。西藏地区传统发酵乳中分离出的 51 株乳杆菌运用 3 种酶进行酶切,通过与参考菌株比对有 19 株 *Lactobacillus fermentum*, 22 株 *Lactobacillus casei*, 5 株 *Lactobacillus plantarum* 和 3 株 *Lactobacillus hel-*

veticus。只有 2 株菌(IMAU60027, IMAU60028)显示了独特的带型,无法将其鉴定到种。



1: IMAU60027, 2: IMAU60018, 3: IMAU60116, 4: IMAU60109, 5: IMAU60042, 6: IMAU60026, 7: IMAU60125, 8: IMAU60078, 9: *Lactobacillus acidophilus* AS1. 1878, 10: *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii* AS1. 2624, 11: *Lactobacillus coryniformis* subsp. *coryniformis* AS1. 1879, 12: *Lactobacillus rhamnosus* AS1. 2134, 13: *Lactobacillus helveticus* AS1. 2278, 14: *Lactobacillus casei* AS1. 2435, 15: *Lactobacillus plantarum* AS1. 2437, 16: *Lactobacillus fermentum* AS1. 1880, 17: *Lactobacillus animalis* AS1. 2623 DSM2623, M: DL 2000 DNA Marker

图 3 部分菌株和 9 株参考菌株 16S rDNA 的 *Hinf I*, *Hae III*, *Alu I* 限制性酶切图谱

Fig. 3 16S rDNA RFLP patterns of partial strains and nine control strains digested with *AluI* (a), *HinfI* (b) and *HaeIII* (c)

2.4 生理生化结果

以 *Lactobacillus helveticus* AS1. 2278 和 *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii* AS1. 2624 为乳杆菌参考菌株,对 8 株杆菌进行生理生化实

验、糖发酵试验和乳酸旋光性的测定,实验结果见表1。根据实验结果,参照文献[9,14]进行检索,结果与16S rDNA-RFLP鉴定结果一致,见表2。

2.5 测序结果及系统发育树分析

将序列进行BLAST比对并提交到NCBI数据库

库,比对结果和上传序列号见图4。利用软件Mega4中的Neighbor-joining法对8株乳杆菌作系统进化树,比较了它们之间的进化距离。图4结果显示,它们与标准菌株的同源性均在99%以上。

表1 西藏地区传统发酵乳中部分乳杆菌的发酵特性

Tab.1 Physiological characteristics of a part of *lactobacilli* isolated from home made fermented milk in Tibet

菌株编号	IMAU 60026	IMAU 60027	IMAU 60078	IMAU 60125	IMAU 60042	IMAU 60018	IMAU 60116	IMAU 60109	AS1.2 278	AS1.2 624
12 Lactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+w
过氧化氢酶	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
葡萄糖产气	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
15℃生长	++	+++	+	+	++	-	-	+++	-	-
45℃生长	+++	++	++	++	++	++++	++++	+++	++++	++++
耐热性 4 g/dL NaCl	+w	+	+w	-	+	+	+	+	+	+
生长 pH 3.0 生长	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-
pH 4.5 生长	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+w
pH 4.5 生长	+	+	+w	-	+	+	+	+	++++	++++
乳酸旋光性	DL	/	/							
1 Arabinose	-	-	-	-	+w	-	-	-	-	-
2 Xylose	-	-	-	-	+w	-	-	-	-	-
3 Rhamnose	-	-	-	-	+w	-	-	+w	-	-
4 Ribose	+	-	+	+w	+	-	-	+	-	-
5 Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6 Mannose	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+
7 Fructose	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+
8 Galactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
9 Sucrose	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-
10 Maltose	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-
11 Cellobiose	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-
12 Lactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+w
13 Trehalose	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-
14 Melibiose	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-
15 Raffinose	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-
16 Melezitose	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
21 Mannitol	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-
22 Sorbitol	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
24 Aesculin	+	+w	-	-	+	-	-	+w	-	-
25 Salicin	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-
26 Amygdalin	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-
28 Sod-Glu	+w	-	+w	-	+	-	-	+	-	-

注: - : 阴性结果, + : 阳性结果, +w : 弱阳性结果, ++ : 强阳性。L: L-乳酸, DL: DL-乳酸, D: D-乳酸。

表 2 部分乳杆菌 16S rDNA RFLP 分析、16S rDNA 序列分析和传统生理生化鉴定结果对照

Tab. 2 Identification results of partial *Lactobacilli* based on RFLP physiological analysis of 16S rDNA sequences and biochemical characteristics

菌号	GenBank/EMBL/DD BJ 序列注册号	16S rDNA RFLP 鉴定结果	16S rDNA 测序结果	生理生化 结果
IMAU60018	FJ211390	<i>L. helveticus</i>	<i>L. helveticus</i>	<i>L. helveticus</i>
IMAU60042	FJ211391	<i>L. plantarum</i>	<i>L. plantarum</i>	<i>L. plantarum</i>
IMAU60026	FJ211392	<i>L. plantarum</i>	<i>L. plantarum</i>	<i>L. plantarum</i>
IMAU60027	FJ211393	待定	<i>L. crustorum</i>	待定
IMAU60109	FJ211394	<i>L. casei</i>	<i>L. casei</i>	<i>L. casei</i>
IMAU60125	FJ211395	<i>L. fermentum</i>	<i>L. fermentum</i>	<i>L. fermentum</i>
IMAU60078	FJ211396	<i>L. fermentum</i>	<i>L. fermentum</i>	<i>L. fermentum</i>
IMAU60116	FJ215675	<i>L. helveticus</i>	<i>L. helveticus</i>	<i>L. helveticus</i>

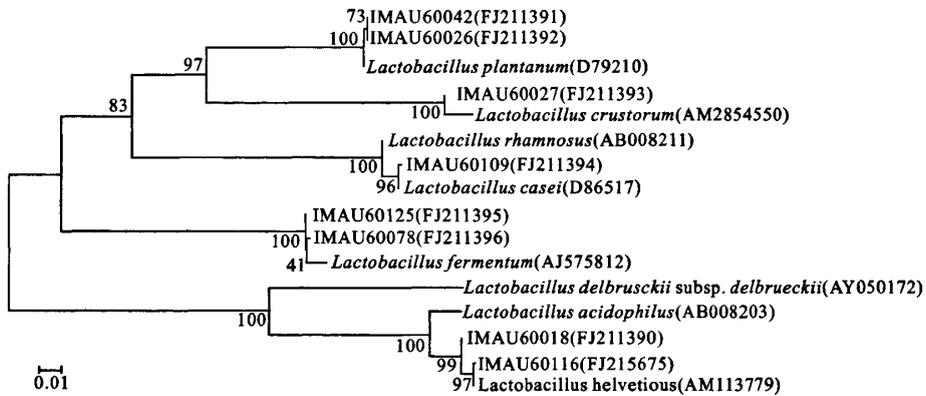


图 4 8 株待测菌株与标准菌株 16S rDNA 序列系统发育树

Fig. 4 Phylogenetic tree of the 16S rDNA of reference strains and eight isolates

3 结 语

由于不同种属的乳杆菌培养条件和营养需求差异很小,所以采用传统的鉴定方法很难对其进行准确的鉴定^[15]。近年来,随着分子分类学的发展和完善,特别是基于细菌 16S rRNA 基因序列的分子分类学的发展,其在细菌系统分类学研究中起着越来越重要的作用。

作者运用 16S rDNA 和 RFLP 相结合的技术,对我国西藏地区自然发酵乳中分离到的 51 株乳杆菌进行鉴定和分类。实验中,通过 NEBcutter V2.0 选出的 3 种限制性内切酶 Hae III、Hinf I 和 Alu I 酶切位点相对较少,聚丙烯酰胺凝胶电泳后条带清晰、简单便于分析,然而由于某些酶切位点处于 16S rDNA 的保守区域,所以不同菌株的酶切图谱比较

相近,这就需要几种酶互相补充进行鉴定。2006 年 Yanagida^[16]采用 AccII, HaeIII 和 MspI 对分离自土壤中的 42 株乳酸菌进行酶切分型,以上报道均证明依靠单一的酶切无法进行分类和鉴定。由于此实验仅选取乳制品中常见的参考菌种,所以 2 株与参考菌的带型均不一致的菌株因为缺少已知分类地位的标准菌株而无法归属,通过 16S rDNA 测序实验鉴定其为 *L. crustorum* (IMAU60027, IMAU60028)。

根据 16S rDNA-RFLP 鉴定结果选出有代表性的 8 株菌进行 16S rDNA 序列测定和传统生理生化鉴定,结果均与 16S rDNA-RFLP 结果相吻合,表明 16S rDNA_RFLP 相对比较适用于大批量的菌种分类鉴定,如果有部分菌株无法归属则进一步采用测序进行鉴定。这一简便、准确的乳酸菌分类鉴定方

法可广泛应用到菌种的研究和食品发酵工业。

参考文献(References):

- [1] 崔艳伟, 孟祥晨. 乳杆菌的分离及鉴定[J]. 东北农业大学学报, 2008, 39(6): 115-119.
Cui Yan-wei, Meng Xiang-chen. Isolation and identification of several *Lactobacilli*[J]. *Journal of Northeast Agricultural University*, 2008, 39(6): 115-119. (in Chinese)
- [2] 孙天松. 中国新疆地区传统发酵酸马奶的化学组成及乳酸菌生物多样性研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2006.
- [3] 蒋德明, 周秀文, 田晓翔, 等. 基于 16S rRNA 和 HSP60 基因序列分析粘细菌亚目形态分类的种属之间的亲缘关系[J]. 微生物学报, 2008, 48(6): 711-716.
Jiang De-ming, Zhou Xiu-wen, Tian Xiao-xiang, et al. Phylogenetic analysis of the 16S rRNA and HSP60 gene sequences of the morphology-based taxa of myxobacteria [J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2008, 48(6): 711-716. (in Chinese)
- [4] Ausube F M, Brent R, Kingston R E, et al. *Current Protocols in Molecular Biology*[M]. New York: John Wiley & Sons, 1994.
- [5] Zhou J Z, Bruns M A, Tiedje J M. DNA recovery from soil of diverse composition[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, 62: 316-322.
- [6] Mora B, Fortina M G, Nicastro G, et al. Genotypic characterisation of *Thermophilic bacilli*: a study on new soil isolates and several reference strains[J]. *Research in Microbiology*, 1998, 149: 711-722.
- [7] Jensen M A, Webster J A, Strauss N. Rapid identification of bacteria on the basis of polymerase chain reaction-amplified ribosomal DNA spacer polymorphisms[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1993, 59: 943-952.
- [8] Giraffa G, Lazzi C, Gatti M, et al. Molecular typing of *Lactobacillus delbrueckii* of dairy origin by PCR-RFLP of protein-coding genes[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2003, 82: 163-172.
- [9] 凌代文. 乳酸菌分类鉴定及实验方法[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1999.
- [10] 小崎道雄, 内村泰, 冈天早苗. 乳酸菌実験マニュアル[M]. 東京: 朝倉店, 1992, 29-72.
- [11] Thompson J D, Gibson T J, Plewniak F, et al. The Clustal_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools [J]. *Nucleic Acids Research*, 1997, 25: 4876-4882.
- [12] Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 1987, 4: 406-425.
- [13] Tamura K, Dudley J, Nei M, et al. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4. 0 [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2007, 24: 1596-1599.
- [14] Kandler O, Weiss N. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* [M]. Baltimore: Williams & Wilkins, 1986: 1209-1245.
- [15] José L B, Ignacio D B, Imanol R Z, et al. Sequencing of variable regions of the 16S rRNA gene for identification of lactic acid bacteria isolated from the intestinal microbiota of healthy salmonids. Compar[J]. *Microbiology and Infectious Diseases*, 2007, 30: 111-118.
- [16] Yanagida F, Chen Y, Yasaki M. Isolation and characterization of lactic acid bacteria from lakes [J]. *Journal of Basic Microbiology*, 2007, 47: 184-190.

(责任编辑:李春丽)