

文章编号: 1673 1689(2010)05-0735-07

制作云南乳扇用酸乳清中乳杆菌的多样性分析

剧柠, 张家超, 孙志宏, 刘文俊, 靳烨, 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, 内蒙古 呼和浩特 010018)

摘要: 针对制作云南乳扇用酸乳清中的乳杆菌的来源及种属, 对其多态性进行研究。采用 AFLP 技术和 NTSYS-pc2.1 软件对从云南大理白族地区牧民家庭制作乳扇用的酸乳清中分离出的 70 株乳杆菌进行多样性分析。结果表明, AFLP 扩增出的条带清晰, 重复性好, 多态性高。聚类分析表明, 在 0.89 的水平上, 70 株乳杆菌共分为 4 个大群: 高加索乳杆菌群 I、发酵乳杆菌群 II、瑞士乳杆菌群 III 和植物乳杆菌群 IV。其中, 瑞士乳杆菌群 III 中的乳杆菌占供试乳杆菌的 65.7%, 为优势菌群。进一步对优势菌群聚类, 进行种内分型, 以 0.90 为界, 群 III 被分为 8 个基因型。

关键词: 云南乳扇; 酸乳清; 乳杆菌; 多样性; AFLP

中图分类号: TQ 920.1

文献标识码: A

The Polymorphism of *Lactobacilli* from Acid Whey for Dairy Fan in Yunnan Area

JU Ning, ZHANG Jia-chao, SUN Zhi-hong, LIU Wei-jun,
JIN Ye, ZHANG He-ping, SUN Tian-song*

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

Abstract: The target of this study is to investigate the biodiversity of 70 *Lactobacilli* strains, isolated from the acid whey for dairy fan made by herd man families in Yunnan Dali the Bai nationality Region in China, for this, AFLP technique integrated with NTSYS-pc2.1 software was developed to investigate the polymorphism and types of the strains. The results suggested that the amplified bands of AFLP were clear and stable with high repetition and high polymorphisms. The cluster analysis showed that at level 0.89, 70 tested strains were clustered into 4 groups: *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus helveticus* (65.7%) and *Lactobacillus plantarum*. The biodiversity of isolates from III was further investigated. At level 0.90, they were clustered into 8 genotypes.

Key words: Yunnan acid whey, *Lactobacillus*, biodiversity, AFLP

收稿日期: 2009-06-27

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

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

* 通信作者: 孙天松(1967-), 女, 内蒙古四子王旗人, 工学博士, 教授, 主要从事乳品微生物方面的研究。

Email: sts9940@sina.com

乳杆菌具有抗氧化、抑菌、降胆固醇、抗肿瘤以及调节人体生理机能等作用。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,难以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。扩增片段长度多态性(Amplification Fragment Length Polymorphism, AFLP)分析是RFLP技术和PCR技术发展而成一种新型DNA指纹图谱技术,被认为是迄今为止最有效的分子标记技术^[1],在鉴定遗传多样性和物种亲缘关系中显示出较大的优越性,是目前细菌分类和鉴定经常使用的一种检测方法。

乳扇主要产于云南大理白族地区,已有500多年的悠久历史,是当地的一种特色乳制品。乳扇的传统制作方法主要是利用酸乳清凝乳。酸乳清(酸浆)是制作乳扇后剩下的乳清,盛入清洁的瓦罐中,让其自然发酵,在各种乳酸菌的作用下,经过3~5d的自然发酵,pH为3.45~3.87时即可用于制作乳扇,其相当于酸乳生产中的发酵剂。新鲜乳扇和酸乳清中含有一定数量的乳酸菌,这些乳酸菌赋予乳扇特有的风味和质地。

作者以制作乳扇用酸乳清中的乳杆菌为材料,采用AFLP分子标记技术对其进行研究,用以分析这种独特的传统乳制品中乳杆菌的多样性。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

1.1.1 样品来源 15份酸乳清样品采自云南省大理市白族地区。

1.1.2 菌株来源及菌体培养 试验所用菌株为样品中分离出的70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。试验用参考菌株 *Lactobacillus casei* subsp. *casei* ATCC393, *L. casei* ATCC334, *Lactobacillus fermentum* ATCC14931, *Lactobacillus helveticus* ATCC15009, *Lactobacillus plantarum* ATCC14917, *Lactobacillus kefirgranum* CCM7068: 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70株乳酸菌以体积分数1%接种在液体MRS培养基中,37℃下培养18~20h,按此方法活化两代后备用。

1.1.3 仪器和试剂 高速冷冻离心机,PCR扩增仪,电泳仪,电泳槽,凝胶成像仪,水平电泳槽,电热

恒温培养箱。缓冲液与常备试剂参考文献[2]制备。内切酶购自Promega公司;rTaq酶、dNTP、DNA Marker等试验用试剂均购自Takara公司。

1.1.4 接头和引物 *EcoR* I 接头: 5'-CTCGTAGACTGCGTA-3', 3'-CTGACGCATGGT-TAA-5', *Mse* I 接头: 5'-GACGATGAGTCCTGA-3', 3'-TACTCAGGACTCAT-5'。引物 *EcoR* I: 5'-GACTGCGTACCAATTG-3', 引物 *Mse* I: 5'-GATGAGTCCTGAGTAA-3' 引物 *EcoR* I+GT: 5'-GACTGCGTACCAATTCGT-3', 引物 *Mse* I+T: 5'-GATGAGTCCTGAGTAAT-3' (Takara公司合成)

1.2 实验方法

1.2.1 菌株基因组DNA提取 采用改良的CTAB法提取^[14]

1.2.2 酶切—连接 酶切体系: 10×MUTLTCORE™ buffer 2.0 μL, *EcoR* I 5U, *Mse* I 5U, 基因组DNA 250 ng, 补充ddH₂O至20 μL; 37℃酶切4.0 h,之后进行连接反应。*Mse* I 接头 2.5 μmol/L, *EcoR* I 接头 0.5 μmol/L, T₄ DNA 连接酶 2 U, 37℃连接过夜。

1.2.3 预PCR PCR体系为10×PCR buffer 2 μL, dNTP 0.2 mmol/L, 酶切连接产物 5 μL, 引物 *EcoR* I 0.15 μmol/L, 引物 *Mse* I 0.15 μmol/L, MgCl₂ 2 mmol/L, rTaq DNA 聚合酶 1.5 U, 补ddH₂O至20 μL。PCR反应程序为94℃5 min; 95℃30 s, 56℃30 s, 72℃60 s, 23个循环; 72℃10 min。产物稀释25倍后用于选择性PCR。

1.2.4 选择性PCR 利用降落PCR进行选择性的扩增。PCR体系: 10×PCR buffer 2.0 μL, dNTP 0.2 mmol/L, 酶切连接产物 5 μL, 引物 *EcoR* I 0.15 μmol/L, 引物 *Mse* I 0.15 μmol/L, MgCl₂ 2 mmol/L, rTaq DNA 聚合酶 1.5 U, 补ddH₂O至20 μL。PCR反应程序为94℃5 min; 94℃30 s, 65℃30 s, 72℃60 s, 2个循环; 然后退火温度每1个循环降低0.7℃, 降至56℃后,再以该温度扩增23个循环; 72℃1 min。

1.2.5 电泳 在PCR产物中加入8 μL的上样缓冲液(98 g/dL去离子化甲酰胺, 10 mg/mL EDTA, 1 mg/mL二甲苯青, 1 mg/mL溴酚蓝, pH 8.0), 混匀后吸取10 μL到6.0 g/dL的变性聚丙烯酰胺凝胶(含7.5 mol/L尿素)上电泳。电泳结束后,采用银染法对变性胶染色后照相。

1.2.6 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,

并在变性聚丙烯酰胺凝胶上检测 AFLP 的重复性。

1.2.7 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 AFLP 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 结果与分析

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 g/dL 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 23 000 bp 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。

2.2 AFLP 标记方法

2.2.1 AFLP 双酶切结果 在 AFLP 分析中, 使用的酶有两种, 一种为高频剪切酶, 识别位点为四碱基的 (frequent cutter); 一种为低频剪切酶, 识别位点为六碱基的 (rare cutter)。不同的内切酶组合及选择性碱基的数目和种类可调整酶切片段的数目, 从而产生不同的 AFLP 指纹^[3]。AFLP 分析可以采用的限制性内切酶有多种, 包括 *EcoR* I, *Hind* III, *Pst* I, *Bgl* II, *Xba* I, *Taq* I, *Mse* I 等。进行 AFLP 分析可以采用单酶切^[4], 也可以采用双酶切。一般多采用稀有切点限制性内切酶与多切点限制性内切酶相搭配使用的双酶切。目前常用的两种酶是 4 个识别位点的 *Mse* I 和 6 个识别位点的 *EcoR* I。*Mse* I (识别序列为 TTAA) 对比其它的内切酶可以产生分布均匀的较小的片段, 因此 *Mse* I 是一种较理想的多切点酶。应用 *EcoR* I 或其它切点数较少的酶, 效果相差不大, 但 *EcoR* I 较便宜^[5]。限制性内切酶的选择对 AFLP 分析的准确度具有关键性作用, 其选择要根据分析对象的种类和所要达到的分辨率决定, 见图 2。

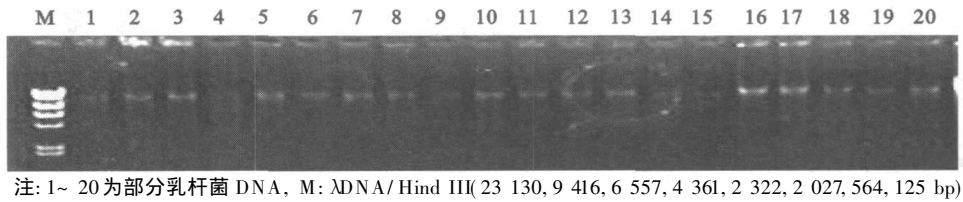


图 1 部分乳酸菌基因组 DNA 琼脂糖凝胶电泳检测
Fig. 1 Electrophoresis pattern derived from DNA of *Lactobacilli*

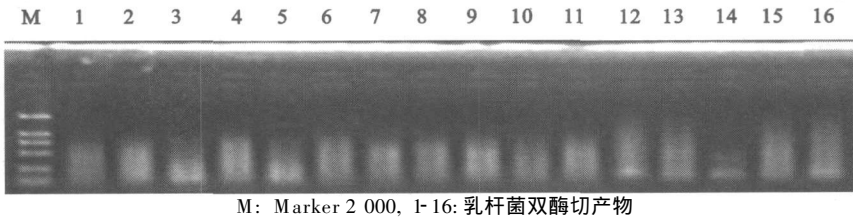
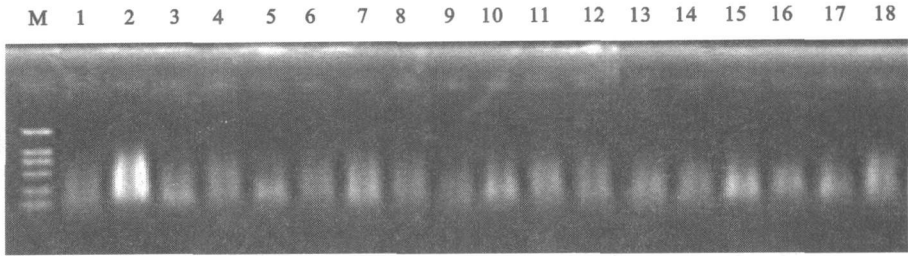


图 2 双酶切产物琼脂糖电泳图
Fig. 2 Electrophoresis pattern derived from AFLP digestion of *Lactobacilli*

另外, 酶切时间也会影响 AFLP 分析的后续步骤。酶切时间太短, 酶切不充分, 片段太大, 效果不理想; 酶切时间太长, 会延长实验周期。石丽雪^[6]、鞠秀芝^[7]等认为酶切时间为 4 h 为宜。作者对 DNA 模板进行 4 h 的酶切处理, 从电泳图中可以看出酶切充分, 片段大小集中在 100~1 000 bp, 满足

AFLP 后续实验的要求。
2.2.2 AFLP 连接接头以及预扩增的结果 将双酶切产物在 37 ℃水浴锅中连接 16 h, 对连接产物进行预扩增后经琼脂糖电泳检测会出现相应的扩增条带, 即在 100~1 000 bp 出现 smear 现象, 见图 3, 说明连接成功, 可以进行下一步实验。



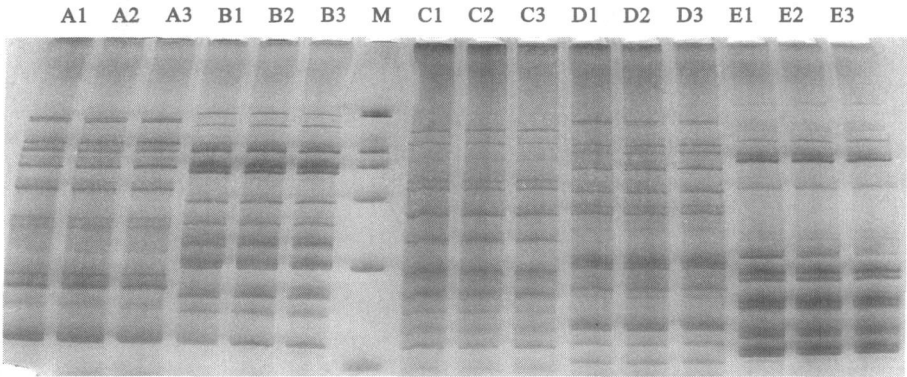
注：M：Marker 2000，1-18：部分乳杆菌预扩增产物

图 3 AFLP 预扩增产物琼脂糖电泳图

Fig. 3 Electrophoresis pattern derived from AFLP preamplification of *Lactobacilli*

2.2.3 AFLP 重复性 国外关于 AFLP 分子标记的重复性报道很多。Hartl 等^[8]在验证 AFLP 技术的重复性时，发现在图谱中平均有 0.5% 清晰可见的条带出现缺失；MARK 等^[9]的实验表明，在排除弱带、过大或过小的条带后，AFLP 是一种重复性很

高的分子标记技术。Edward 等^[10]使用 AFLP 标记时，重复性样品之间的相似性为百分之百。一系列的实验表明，AFLP 标记技术是一种重复性很高技术。作者对 5 株标准菌进行重复性实验，见图 4。结果显示 AFLP 重复性很高。



注：A: *Lactobacillus amylophilus* ATCC49845, B: *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 C: *Lactobacillus casei* subsp. *casei* ATCC393, D: *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii* ATCC 11842 E: *Lactobacillus casei* ATCC334 为标准菌株, M: Marker DL2000

图 4 AFLP 重复性实验电泳图

Fig. 4 Electrophoresis pattern derived from repeating tests of AFLP

2.3 乳杆菌的 AFLP 分析

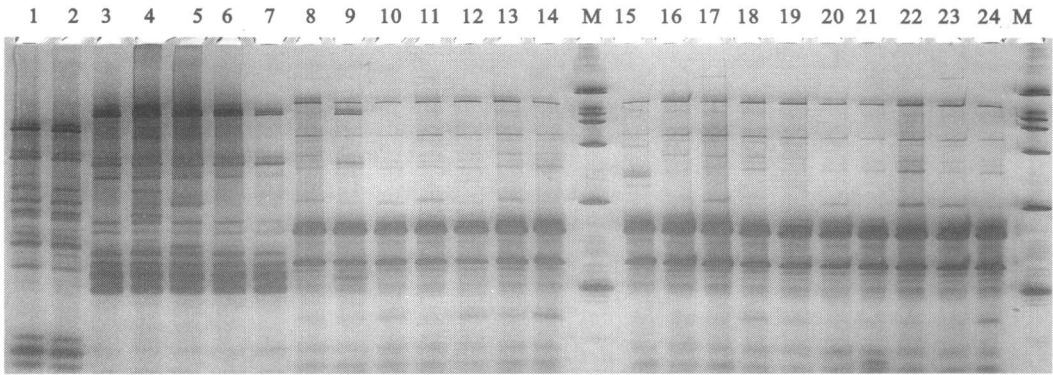
70 株供试菌株和 4 株标准菌株总共扩增出 75 种、787 条 DNA 条带，平均每株菌扩增出 11.24 条带，DNA 条带清晰。菌 IMAU50039 扩增条带最多，为 30 条，菌 IMAU50073，IMAU50032，IMAU50030 和 IMAU50051 扩增条带最少，仅有 9 条。图 5 为部分菌株的 AFLP 电泳图。从图 5 中可以看出扩增的 DNA 条带清晰，可用于条带分析。

2.4 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，结果见图 6。由图 6 可知以 0.89 作为分界点，70 株供试乳杆菌和 4 株标准菌株可分为 5 个类群：I~V。类群 I 包括 12 株供试乳杆菌。这 12 株乳杆菌和参考菌株 *L. kefirgranum* CCM7068 聚为一类。其中，菌 IMAU50002 和 IMAU50003 相似系数为百分之百，分离自同一样品，且生化鉴定结

果一样，可能为同一株菌。菌 IMAU50067 和 IMAU50060 的相似系数为百分之百，分离自同一样品，也可能为一株菌。群 II 包括参考菌株 *L. fermentum* ATCC14931 和 9 株供试乳杆菌。其中，菌 IMAU50078 和 IMAU50088；IMAU50008，IMAU50074 和 IMAU50076 的相似性系数为百分之百。

群 III 为所有菌群中最大的一类，包括参考菌 *L. helveticus* ATCC15009 和供试菌株 46 株，占有供试菌株的 65.7%，为优势菌种。供试菌株 IMAU50045 和 *L. plantarum* ATCC 14917 被聚类于群 IV。值得注意的是传统生理生化方法鉴定为瑞士乳杆菌的 IMAU50053，被单独的聚类出来(群 V)，关于该菌的具体归属，需其它实验进一步验证。除此之外，其它所有菌株的聚类结果和传统鉴定结果相吻合。



注: 1~ 24 为部分乳杆菌 AFLP 电泳图谱; M: 2000

图 5 部分云南乳扇制品中乳杆菌的 AFLP 电泳图

Fig. 5 AFLP fingerprints of genomic DNAs of *Lactobacillus* strains

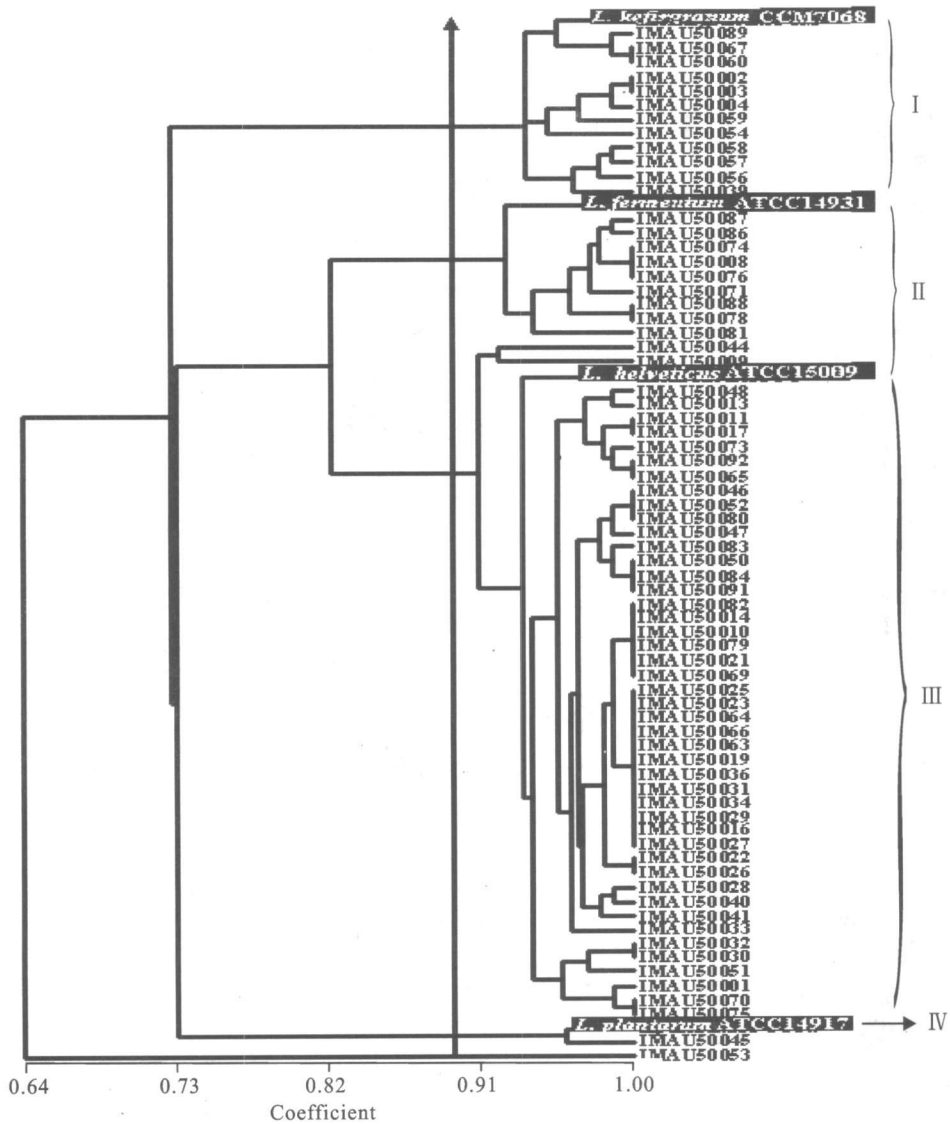


图 6 云南乳扇制品中乳杆菌的 AFLP 聚类图

Fig. 6 UPGMA dendrogram derived from the AFLP finger prints of *Lactobacillus* strains

2.5 AFLP 的种内分型

对优势菌群 III, 即瑞士乳杆菌群, 使用软件绘制聚类图, 进行单独的种内分型。由于菌株数的减少, 使得基因的多态位点数降低, 最终导致分型情

况与全体菌株分类时不同。以 0.9 为分界点, 48 株乳杆菌被分成 8 个基因型, 见图 7。从图 7 中可以看到, 菌 *L. helveticus* ATCC15009, IMAU50044 和 IMAU50009 分别构成 3 个单独的基因型;

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, 完全可以满足下一步的 PCR 实验所需模板的要求。

2) AFLP 试验的重复性: 关于 AFLP 标记实验的重复性国外的报道很多。这些报道一致认为该技术虽然存在着一定的误差, 但并不影响实验数据的读取和实验结果的准确性, 并且与其他分子标记的方法相比较(RAPD, ERIC 等)其重复性和准确度更高。国内使用 AFLP 对乳酸菌进行分析的报道很少, 李海星等的实验也证明了这点。作者的重复性实验也充分说明了 AFLP 实验重复性很好。

3) AFLP 的多态性: 国外使用 AFLP 对乳酸菌的多态性进行研究的报道有很多, 这些报道都说明 AFLP 技术是一种多态性很高的分子标记技术。

M. Vancanneyt^[13]等使用 3 对引物对不同地区的乳杆菌进行了分型, 证明了 AFLP 可以区分乳杆菌种间的多样性。作者使用参考菌株和来自于云南大理白族地区制作乳扇用的酸乳清中的乳杆菌进行了分析, 除菌 IMAU50053 外, 所有结果和传统鉴定方法相吻合。菌 IMAU50053 需进一步研究。分离自酸乳清的乳杆菌随机的分布于各个分类群中。此外, 对优势菌群 III(瑞士乳杆菌群)进行进一步的聚类分析发现, 相似性系数为百分之百的菌并不少, 出现这一结果的原因可能与引物对的选择或凝胶的分辨率有关。选择更多引物对相结合的方法将对优势菌群种内的分型更加清晰。因此有必要对优势群中的菌在下一步研究中改变引物中选择性核苷酸的种类和数目来进行进一步的分析。

参考文献(References):

- [1] 杨振泉, 顾瑞霞. DNA 标记技术在乳酸菌分类鉴定中的应用[J]. 中国乳品工业, 2005, 33: 35–39.
YANG Zheng quan, GU Rui xia. DNA marking technology applied in classification and identification of lactic acid bacterium[J]. **China Dairy Industry**, 2005, 33: 35–39. (in Chinese)
- [2] 奥斯伯 F, 布伦特 R. 精编分子生物学实验指南[M], 颜子颖 译. 北京: 科学出版社, 1998.
- [3] 郑先云, 郭亚平, 马恩波. AFLP 分子标记技术的发展[J]. 生命的化学, 2003, 23 (1): 65–67.
AFLP Molecular Genetic Marker and Its Optimizing[J]. **Chemistry of Life**, 2003, 23 (1): 65–67. (in Chinese)
- [4] 万春玲, 谭远德. AFLP 的一种改进方法[J]. 南京师范大学学报: 自然科学版, 1999, 22(2): 87–91.
WAN Chun ling, TAN Yuan de. An Improvement Method of AFLP[J]. **Journal of Nanjin Normal University: Natural Science Edition**, 1999, 22(2): 87–91. (in Chinese)
- [5] 李珊, 赵桂仿. AFLP 分子标记及其应用[J]. 西北植物学报, 2003, 23(5): 830–836.
LI Shan, ZHAO Gui fang. AFLP molecular marker and its application[J]. **Acta Botanica Boreali Occidentalia Sinica**, 2003, 23(5): 830–836. (in Chinese)
- [6] 石丽雪, 沙广利, 王斌, 等. 苹果性状标记 AFLP 技术体系的建立和优化[J]. 山东农业科学, 2006, 02: 15–20.
SHI Li xue, SHA Guang li, WANG Bin, et al. Establishment and optimization of AFLP technology system used to mark characteristics of apple[J]. **Shandong Agricultural Sciences**, 2006, 02: 15–20. (in Chinese)
- [7] 鞠秀芝, 杜胜利, 宗兆锋, 等. AFLP 技术及其常见问题与解决方案[J]. 天津农业科学, 2004, 10 (4): 6–9.
JU Xiu zhi, DU Sheng li, ZONG Zhao feng, et al. AFLP and its common problems and solutions[J]. **Tianjin Agricultural Sciences**, 2004, 10 (4): 6–9. (in Chinese)
- [8] Hartl L, Seefelder S. Diversity of selected hop cultivars detected by fluorescent AFLPs[J]. **Theor Appl Genet**, 1998, 96: 112–116. (in Chinese)
- [9] Mark J, Bagley, Susan L, et al. Choice of methodology for assessing genetic impacts of environmental stressors: polymorphism and reproducibility of RAPD and AFLP fingerprints[J]. **Ecotoxicology**, 2001, 10: 239–244. (in Chinese)
- [10] Edward J, Perkins, William J, et al. Development of amplified fragment length polymorphism markers for *Spartina alterniflora*[J]. **Aquatic Botany**, 2002, 74: 85–95.
- [11] Uta P, Zngo S. Minipreparation method for isolation of DNA from plant with a high content of polyphenolics [J]. **Nucleic Acid Res**, 1993, 21(4): 3328–3330.
- [12] Michael B, Antonia V, Alfonso N, et al. Riboprinting and 16S rRNA gene sequencing for identification of brewery *Pedicroccus* isolates[J]. **Appl Environ Microbiol**, 2001, 67(2): 553–560.
- [13] Vancanneyt M, Huys G, Lefebvre K, et al. Intraspecific genotypic characterization of *Lactobacillus rhamnosus* strains intended for probiotic use and isolates of human origin[J]. **Applied and Environmental Microbiology**, 2006, 72(8): 5376–5383.
- [14] Michael B, Antonia V, Alfonso N, et al. Riboprinting and 16S rRNA gene sequencing for identification of brewery *Pedicroccus* isolates [J]. **Appl Environ Microbiol**, 2001, 67(2): 553–560.

(责任编辑: 李春丽)