

• 基础实验研究论著 •

用多位点序列分析技术鉴定 9 株产高光学纯度 D-乳酸野生菌株

姚 纲^{1,2}, 胡红焱³, 梁 慧³, 张健鹏^{4△}

(1. 新乡医学院, 河南新乡 453003; 2. 陕西省凤翔县医院呼吸科, 陕西凤翔 721400;
北京武警总医院; 3. 检验科; 4. 呼吸科, 北京 100039)

摘要:目的 对从某发酵食品中分离纯化出的 9 株产高光学纯度 D-乳酸的野生菌株(SZD 菌株)进行鉴定。方法 先结合表型特征及 16S rRNA 基因序列分析将 SZD 菌株鉴定到种的水平, 再通过综合分析 hsp60、pheS、rpoA 及 tuf 基因的多位点序列分析(MLSA)技术将其鉴定到亚种的水平。结果 SZD 菌株的 16S rRNA 基因序列与棒状乳杆菌扭曲亚种及棒状亚种相应序列的相似率均达 99.9% 以上。SZD 菌株的 pheS 基因序列与棒状乳杆菌棒状亚种及扭曲亚种的相应序列的相似率分别为 100% 和 97.87%, 而 rpoA 基因序列与棒状乳杆菌棒状亚种及扭曲亚种的相应序列的相似率分别为 98.65% 和 100%; tuf 基因序列与棒状乳杆菌两个已知亚种相应序列的相似率均为 99.00% 以上, 而 hsp60 基因序列与棒状乳杆菌两个已知亚种相应序列的相似率均为 99.00% 以下。在用应用算术平均数的非加权成组配对法构建的基于 16S rRNA、hsp60、tuf 和 pheS 基因的进化树中, SZD 菌株独立于棒状乳杆菌的两个已知亚种而自成一枝。因此, 将 SZD 菌株鉴定为棒状乳杆菌的一个新亚种。结论 结合表型特征及 16S rRNA 基因序列分析将 SZD 菌株鉴定为棒状乳杆菌, 最后通过基于 hsp60、pheS、rpoA 及 tuf 基因的 MLSA 技术将其鉴定为棒状乳杆菌一个新的亚种。

关键词: 多位点序列分析; 鉴定; D-乳酸; 棒状乳杆菌

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2013.20.004

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2013)20-2647-03

A study on identification of wild strains produced high optical purity D-lactic acid via MLSA technology

Yao Gang^{1,2}, Hu Hongyan³, Liang Hui³, Zhang Jianpeng^{4△}

(1. Xinxiang Medical College, Xinxiang, He'nan 453003, China; 2. Department of Respiratory Medicine, Fengxiang County Hospital of Shaanxi, Fengxiang, Shaanxi 721400, China; 3. Department of Clinical Laboratory; 4. Department of Respiratory Medicine, the General Hospital of Chinese People's Armed Police Forces, Beijing 100039, China)

Abstract: **Objective** To identify nine strains of wild type bacteria(SZD strains) which produced high optical purity D- lactic acid from a fermented food. **Methods** According to the phenotypic characteristics and analysis of 16S rRNA gene sequence, the SZD strains were identified to the species level, and then these isolates were identified to the subspecies level via the multilocus sequence analysis(MLSA) technology based on hsp60, pheS, rpoA and tuf genes. **Results** The similarity rates of the corresponding sequence of 16S rRNA gene among the SZD strains, *Lactobacillus coryniformis* subsp. *coryniformis* and *Lactobacillus coryniformis* subsp. *torquens* were more than 99.9%. The similarity rates of the corresponding sequence of pheS gene among the SZD strains, *Lactobacillus coryniformis* subsp. *coryniformis* and *Lactobacillus coryniformis* subsp. *torquens* were 100% and 97.87%, respectively; while, the similarity rates of the corresponding sequence of rpoA gene between these strains were 98.65% and 100%, respectively. The similarity rates of the corresponding sequence of tuf gene among the SZD strains and two known subspecies of *Lactobacillus coryniformis* were more than 99.00%; in contrast, the similarity rates of the corresponding sequence of hsp60 gene among these strains were less than 99.00%. The phylogenetic trees constructed by unweighted pair-group method using arithmetic average based on 16S rRNA, hsp60, tuf and pheS genes showed that the SZD strains were independent of the two known subspecies of *Lactobacillus coryniformis*, and formed a unique branch. Therefore, the SZD strains were identified as a novel subspecies of *Lactobacillus coryniformis*. **Conclusion** According to the phenotypic characteristics and analysis of the 16S rRNA gene sequence, SZD strains are identified as *Lactobacillus coryniformis*. These isolates are identified as a novel subspecies of *Lactobacillus coryniformis* via the MLSA technology based on hsp60, pheS, rpoA and tuf genes finally.

Key words: multilocus sequence analysis; identification; D-lactic acid; *Lactobacillus coryniformis*

乳酸学名 α -羟基丙酸, 是一种重要的可降解、无污染的化工原料, 其在食品、医药、化妆品、农药、高分子材料等领域有着广泛的用途, 具有重要的经济价值^[1]。由于乳酸分子中有一个不对称的碳原子, 因此有两种旋光异构体, 即右旋乳酸(D-乳酸)和左旋乳酸(L-乳酸)。目前 L-乳酸的生产工艺和分离制备技术已非常成熟, 而 D-乳酸的制备较为复杂、且成本较高, 同等级的 D-乳酸价格约为 L-乳酸的 5~10 倍。乳酸的生产主要采用发酵法, 发酵法制备 D-乳酸的主要技术瓶颈是缺乏产高光学纯度(光学纯度大于 97%)D-乳酸的菌株。因此, 产高

光学纯度 D-乳酸菌株的选育具有重大的研究价值和广阔的应用前景。作者从某发酵食品中分离并纯化出 9 株野生菌株, 产 D-乳酸光学纯度达 100%, 将其命名为 SZD 菌株, 初步鉴定为棒状乳杆菌(*Lactobacillus coryniformis*)。本文拟通过多位点序列分析(MLSA)技术综合分析这 9 株野生菌株的 16S rRNA、hsp60、pheS、rpoA 及 tuf 基因序列以对其进行进一步鉴定。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂 9 株 SZD 菌株均分离自陕西的一种发酵食

品,编号分别为 SZD-1、SZD-2、SZD-3、SZD-4、SZD-5、SZD-6、SZD-8、SZD-9、SZD-10,其中具有代表性的 4 株(SZD-2、SZD-5、SZD-9、SZD-10)保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,保藏编号分别为:CGMCC No. 6891~6894。

MRS 肉汤培养基基础(北京奥博星生物技术有限责任公司)。Chelex-100 树脂(美国 BioRad 公司),琼脂糖 G-10(美国 Gene 公司),溴乙啶(美国 Promega 公司),Ex Taq 聚合酶试剂盒及 DL2 000 DNA Marker 均购自宝生物工程大连有限公司。16S rRNA 基因的扩增采用 16S rRNA 基因细菌通用引物^[2],4 个蛋白编码管家基因的扩增用引物均为自行设计,上述引物均由上海生工生物工程有限公司合成,引物序列见表 1。

表 1 SZD 菌株各目的基因扩增用引物

目的基因	引物序列(5′~3′)
16S rRNA	F:AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG R:ACG GCT ACC TTG TTA CGA CTT
hsp60	F:TGG TGA TGG GAC GAC CAC TGC R:GTT CCA CGG ATC TTG TTC
pheS	F:CCG AAA GAT CAT CCC GCT CGC R:ATC AAC GCC CGC TGC CTT C
rpoA	F:GCG GCG TAT CCT CTT GGC TT R:TCA TCA TGT CAG CTT CAG TCT TGT
tuf	F:CGC AAC TGA TGG CCC AAT GCC R:ATG ACG GCC ACC TTC GTC CTT G

1.2 仪器 其林贝尔干式恒温器 GL-150(江苏海门市其林贝尔仪器制造有限公司),TG16-WS 台式高速离心机(长沙卢湘仪离心机仪器有限公司),TC-312 PCR 仪(英国 Techne 公司),EPS-100 核酸电泳仪(上海圣科仪器设备有限公司),Gel Logic 100 凝胶电泳成像仪(美国 Kodak 公司)。

1.3 方法

1.3.1 基因组 DNA 提取 先用无菌去离子水配制 5%Chelex-100 树脂溶液。在 1.5 mL 离心管中吸取 5%Chelex-100 树脂溶液 200 μL,用无菌竹签从 MRS 固体培养基上挑取适量菌落置入离心管中搅拌,制成相当于 0.5 个麦氏浊度的菌悬液。将装有菌悬液的离心管剧烈振荡 30 s 后置入干式恒温器 100 ℃加热 10 min,冷却至室温后 12 880×g 离心 5 min,上清移入另一离心管中作为扩增模板,-20 ℃保存备用。

1.3.2 PCR 反应扩增目的基因 将上述制备的 SZD 菌株基因组 DNA 作为 PCR 扩增的模板,反应体系由 10×Ex Taq Buffer(Mg²⁺ Plus)5 μL,dNTP Mixture(各 2.5 mmol/L)4 μL、引物 F(10 μmol/L)及引物 R(10 μmol/L)各 2 μL、Ex Taq 聚合酶(5 U/μL)0.25 μL、基因组 DNA 4 μL 组成,最后用无菌去离子水补足至 50 μL。16S rRNA 基因的 PCR 反应条件为:95 ℃预变性 5 min,然后 95 ℃变性 1 min,60 ℃退火 30 s,72 ℃延伸 2 min,30 个循环后 72 ℃延伸 5 min。4 个蛋白编码基因的 PCR 反应条件为:95 ℃预变性 5 min,然后 95 ℃变性 30 s,55 ℃退火 30 s,72 ℃延伸 1 min,35 个循环后 72 ℃延伸 5 min。

1.3.3 目的基因扩增结果检测 取 5 μL PCR 产物于 1.5%琼脂糖凝胶电泳,溴乙啶染色后通过凝胶电泳成像仪照相观察,确认目标基因扩增成功后,PCR 产物送北京天一辉远生物科技公司测序。

1.3.4 目的基因同源性鉴定及系统发育分析 登陆核糖体工程数据库(<http://rdp.cme.msu.edu/index.jsp>)和 GenBank(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>),将测得的 SZD 菌株的 16S rRNA 基因序列及蛋白编码基因序列与基因库中已

注册的核酸序列进行同源性比对,检索出核糖体工程数据库中与 SZD 菌株 16S rRNA 基因序列同源性最高的已知分类地位的 20 个乳杆菌菌种的模式菌株作为参考菌株,然后从 GenBank 中检索出参考菌株的相应目的基因序列。将 SZD 菌株与参考菌株的目的基因序列用 MEGA5.0 软件包^[3]进行多重序列比对(Clustal W 法),然后用应用算术平均数的非加权成组配对法(UPGMA)构建系统进化树,并进行 1 000 次 bootstrap 自举分析以检验置信度。

2 结果

2.1 16S rRNA 基因扩增结果 所有菌株的 16S rRNA 基因均扩增成功,反应产物经电泳检测在约 1 500 bp 处有一清晰条带,与预期目的片段长度相符,见图 1(见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”)。

2.2 4 个蛋白编码基因扩增结果 棒状乳杆菌的 4 个蛋白编码基因均扩增成功,反应产物经电泳检测目的条带清晰特异,与预期目的片段长度相符,见图 2(见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”)。

2.3 目的基因测序结果 扩增的 9 个 SZD 菌株各目的基因的测序结果除两侧末端参差不齐外中间片段完全一致,将各目的基因中间完全一致的片段提交至 GenBank,登录号见表 2。

表 2 SZD 菌株各目的基因序列 GenBank 登录号

基因名称	GenBank 登录号	序列长度(bp)
16S rRNA	JX914660	1 447
hsp60	JX962355	513
pheS	JX962356	423
rpoA	JX966341	687
tuf	JX962357	591

2.4 目的基因同源性鉴定及系统发育分析结果 SZD 菌株的 16S rRNA 基因及 4 个蛋白编码基因序列与棒状乳杆菌同源性最高,与棒状乳杆菌比对的结果见表 3(见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”)。SZD 菌株的 16S rRNA 基因与其他乳杆菌菌种同源性最高的为 *Lactobacillus. backi*,最大序列相似率为 96%;hsp60 基因及 pheS 基因与其他乳杆菌菌种同源性最高的均为双发酵乳杆菌,最大序列相似率分别为 85%和 80%;rpoA 基因与其他乳杆菌菌种同源性最高的为米酒乳杆菌,最大序列相似率为 79%;tuf 基因与其他乳杆菌菌种同源性最高的为干酪乳杆菌,最大序列相似率为 84%。

3 讨论

通过前期研究得知,9 株 SZD 菌株均为革兰阳性短杆菌,无芽孢、无分叉、无动力,兼性厌氧,在 pH 4.5 生长,接触酶及氧化酶阴性,不产吡啶和硫化氢,不液化明胶,从葡萄糖产 D-乳酸但不产气。所有 SZD 菌株均发酵甘露醇、葡萄糖、蔗糖、果糖、半乳糖及甘露糖,不发酵乳糖、苦杏仁苷、阿拉伯糖、纤维二糖、松三糖、木糖及海藻糖,大部分发酵麦芽糖,部分菌株发酵葡萄糖盐。SZD 菌株的上述表型特征与棒状乳杆菌相符。目前棒状乳杆菌分为棒状亚种和扭曲亚种。所有 SZD 菌株均水解七叶灵并发酵水杨苷,部分菌株发酵山梨醇,与棒状乳杆菌扭曲亚种的特性不符;所有 SZD 菌株均产 D-乳酸,使牛奶酸化,不发酵蜜二糖、棉子糖,大部分不发酵鼠李糖,与棒状乳杆菌棒状亚种的特性不符。因此,根据表型特征无法将 SZD 菌株鉴定为棒状乳杆菌两个已知亚种中的任何一种。

目前 16S rRNA 基因序列分析已成为微生物系统分类与鉴定研究中最有用和最常用的分子计时钟,在细菌的鉴定中被认为是“金标准”。有学者认为序列相似率大于 99%鉴定为同一个种,介于 95%~99%鉴定为同一属^[4]。所有 SZD 菌株的

16S rRNA 基因序列与棒状乳杆菌棒状亚种及扭曲亚种相应序列的相似率均达 99.9% 以上。因此,所有 SZD 菌株均鉴定为棒状乳杆菌,但棒状乳杆菌两个已知亚种的 16S rRNA 基因序列之间差异太小,仅凭 16S rRNA 这一个基因无法将 SZD 菌株鉴定至亚种水平。

MLSA 技术通过对多个基因信息进行相互比较、综合分析,可以得到一个比较全面可信的物种间的关系^[5]。作者通过综合分析编码 RNA 聚合酶 α 亚基的 rpoA 基因、编码苯丙氨酰-tRNA 合成酶 α 亚基的 pheS 基因^[6]、编码翻译延伸因子 Tu 的 tuf 基因以及编码热休克蛋白 60 的 hsp60 基因^[7]以对 SZD 菌株进行进一步的鉴定,这些基因较 16S rRNA 基因具有更高的分化程度,因而鉴定分辨率更高,更适于亲缘关系较近的种或亚种之间的鉴定^[8-9]。Naser 等^[9]通过分析代表 98 个种和 17 个亚种的 201 株乳酸杆菌的 pheS 及 rpoA 基因序列发现, pheS 基因的种间差异大多超过 10%,种内差异大多超过 3%; rpoA 基因的种间差异大多超过 5%,种内差异大多超过 2%。SZD 菌株的 4 个蛋白编码基因与其他乳杆菌菌种的同源性差异均大于或等于 15%,与棒状乳杆菌的同源性均差异均小于 3%,故 SZD 菌株均鉴定为棒状乳杆菌。SZD 菌株 pheS 基因序列与棒状乳杆菌棒状亚种及扭曲亚种的相应序列的相似率分别为 100% 和 97.87%,而 rpoA 基因序列与棒状乳杆菌棒状亚种及扭曲亚种的相应序列的相似率分别为 98.65% 和 100%; tuf 基因序列与棒状乳杆菌两个已知亚种相应序列的相似率均为 99.00% 以上,而 hsp60 基因序列与棒状乳杆菌两个已知亚种相应序列的相似率均为 99.00% 以下。以上结果表明, SZD 菌株的 4 个蛋白编码基因序列和棒状乳杆菌的两个已知亚种均不完全相符。在用 UPGMA 法构建的基于 16S rRNA、hsp60 和 tuf 基因的进化树中, SZD 菌株及棒状乳杆菌的两个已知亚种聚类在亲缘关系最近的一个分支上,但 SZD 菌株又单独形成一个分支。在基于 pheS 基因构建的进化树中,棒状乳杆菌的两个已知亚种聚类在同一个分支上,而 SZD 菌株与草乳杆菌聚类于另一个分支。SZD 菌株从系统发育上独立于棒状乳杆菌的两个已知亚种而自成一支。

综上所述, SZD 菌株鉴定为棒状乳杆菌的一个新亚种,建议命名为棒状乳杆菌陕西亚种,模式菌株为 CGMCC No. 6891。但无论是 16S rRNA 序列还是上述 4 个蛋白编码基因序列分析,都只是针对基因组的一部分序列进行分析,并非全基因组水平分析,因而具有一定的局限性^[10]。因此, SZD 菌株

的最终鉴定分类还需要全基因组水平上的鉴定技术,如 DNA 的 G+C 含量测定、DNA-DNA 杂交、限制性片段长度多态性、扩增片段长度多态性及全基因组测序等。

参考文献

- [1] Oshiro M, Shinto H, Tashiro Y, et al. Kinetic modeling and sensitivity analysis of xylose metabolism in *Lactococcus lactis* IO-1[J]. J Biosci Bioeng, 2009, 108(5): 376-384.
- [2] 董银苹, 崔生辉, 李凤琴, 等. 乳酸杆菌及嗜热链球菌的种水平鉴定——16SrRNA 基因 PCR 扩增及序列分析[J]. 卫生研究, 2010, (4): 454-458, 465.
- [3] Tamura K, Peterson D, Peterson N, et al. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods [J]. Mol Biol Evol, 2011, 28(10): 2731-2739.
- [4] 刘朝军, 沈定霞. 16S rDNA 序列测定在细菌鉴定中的应用[J]. 军医进修学院学报, 2011, 32(7): 774-776, 779.
- [5] 赵婷, 程池. MLSA 用于双歧杆菌快速鉴定研究进展[J]. 中国乳品工业, 2011, 39(6): 46-50.
- [6] Naser SM, Thompson FL, Hoste B, et al. Application of multilocus sequence analysis (MLSA) for rapid identification of *Enterococcus* species based on rpoA and pheS genes[J]. Microbiology, 2005, 151(7): 2141-2150.
- [7] Dumonceaux TJ, Hill JE, Briggs SA, et al. Enumeration of specific bacterial populations in complex intestinal communities using quantitative PCR based on the chaperonin-60 target [J]. J Microbiol Methods, 2006, 64(1): 46-62.
- [8] Sheu SJ, Hwang WZ, Chen HC, et al. Development and use of tuf gene-based primers for the multiplex PCR detection of *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* group, *Lactobacillus delbrueckii*, and *Bifidobacterium longum* in commercial dairy products [J]. J Food Prot, 2009, 72(1): 93-100.
- [9] Naser SM, Dawyndt P, Hoste B, et al. Identification of lactobacilli by pheS and rpoA gene sequence analyses[J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2007, 57(12): 2777-2789.
- [10] 庞会利, 谈重芳, 蔡义民, 等. 乳酸菌分类鉴定方法的研究进展[J]. 中国酿造, 2009, (6): 1-5.

(收稿日期: 2013-02-05)

(上接第 2646 页)

- 的回顾与启示[J]. 医学与社会, 2010, 23(11): 4-6.
- [2] World Health Organization. New influenza A / (H1N1) virus: global epidemiological situation[J]. Wkly Epidemiol Rec, 2009, 84(25): 249-257.
 - [3] Duvvuri VR, Heffernan JM, Moghadas SM, et al. The role of cellular immunity in Influenza H1N1 population dynamics[J]. BMC Infect Dis, 2012, 2(1): 329.
 - [4] 范行良, 李长贵, 王大燕, 等. 甲型 H1N1 流感病毒核酸国家参制品的研制[J]. 中国生物制品学, 2009, 22(12): 1193-1195.
 - [5] Kim JI, Lee I, Park S, Park MS. Surface glycoproteins determine the feature of the 2009 pandemic H1N1 virus[J]. BMB Reports, 2012, 45(11): 653-658.
 - [6] Barra IG, McCauley J, Cox N, et al. Epidemiological, antigenic and genetic characteristics of seasonal influenza A (H1N1), A (H3N2) and B influenza viruses: basis for the WHO recommendation on the composition of influenza vaccines for use in the 2009-

- 2010 Northern Hemisphere season [J]. Vaccine, 2010, 28(5): 1156-1167.
- [7] 郭元吉, 程小雯. 流行性感病毒及其实验技术[M]. 中国三峡出版社, 1997: 18-22.
 - [8] Yager EJ, Stagnar C, Gopalakrishnan R, et al. Optimizing particle-mediated epidermal delivery of an influenza DNA vaccine in ferrets [J]. Methods Mol Biol, 2013, 940: 223-237.
 - [9] Wei H, Lenz SD, David H. Thompson, et al. DNA-vaccine platform development against H1N1 subtype of swine influenza A viruses[J]. Viral Immunol, 2012, 25(4): 297-305.
 - [10] 张延龄, 张晖. 疫苗学(修订本)[M]. 北京: 科学出版社, 2006: 1171-1185.
 - [11] 魏晓露, 廖国阳. 流感病毒及相关疫苗的研究概况[J]. 中国预防医学杂志, 2008, 9(4): 320-321.

(收稿日期: 2013-05-05)