

# 双歧杆菌的遗传学研究\*

厦门大学生物系 厦门 361005 杨智源 黄耀坚 苏文金\*\*

## 1 前言

双歧杆菌 (*Bifidobacterium*) 于 1899 年由巴斯德研究所的 Tissier 从母乳婴儿粪便中发现, 是定植于人类或某些哺乳动物体内的革兰氏阳性生理细菌, 在微生态学上属于原籍菌群<sup>[1]</sup>。由于其在肠道微生态中的重要作用以及与人类健康的密切关系, 从而受到重视。

自 1899 年发现该菌以来的近一个世纪中, 国内外学者对其进行了大量的研究, 并取得了丰硕的成果<sup>[3]</sup>, 主要有: 1. 形态学方面, 对该菌的多形态性及分枝的认识, 及其型变机制的了解; 2. 分类学方面, 经多年研究, 将双歧杆菌定为独立的属, 在新版伯杰氏系统细菌学手册中记载了 24 个种, 并且发展了多种分类方法; 3. 在应用方面, 已经有大量的双歧杆菌制剂上市, 在医疗和保健中起着重要的作用。

然而, 在双歧杆菌的基础研究, 尤其是其作用的分子机制研究较少。最近几年, 国外在该菌的遗传学方面已做了一些探索, 本文介绍其研究进展。

## 2 双歧杆菌质粒的研究

质粒是染色体外遗传因子, 普遍存在于各种不同的细菌中。近年来, 由于发现越来越多重要细菌的特殊性质是由质粒编码的, 因此在各类细菌的遗传研究中, 质粒均受到了重视。

肠道菌中的乳杆菌、拟杆菌、厌氧梭菌以及链球菌, 在质粒方面的研究已有不同的进展<sup>[3]</sup>。双歧杆菌质粒的研究相对较少。1982 年, Sgortati 等<sup>[4]</sup>对 1461 株共 24 个种的双歧杆菌进行了质粒的检测, 发现四个种 (总菌株数的 20%) 的双歧杆菌携带有质粒, 这四个种分别是长双歧杆菌、球双歧杆菌、星状双歧杆菌以及印度双歧杆菌。此外也有短双歧杆菌携带质粒的报导<sup>[5]</sup>。其中, 长双歧杆菌及星状双歧杆菌都含有多个质粒, 而球状双歧杆菌及 60% 的

印度双歧杆菌只含有单个质粒。由于检测方法及所检测菌株的限制, 双歧杆菌其它种是否携带有质粒还不能确定, 因此进一步的检测还有待继续进行。对含有质粒的各菌种的质粒电泳图谱进行分析, 发现各种都有各自特定的质粒带型, Southern 杂交也揭示了种内各质粒带型的相关性<sup>[6-7]</sup>, 这些结果揭示了质粒在双歧杆菌分类方面潜在的应用价值, 并且可能为生态和进化的研究提供重要信息。

pNB1 质粒是从短双歧杆菌 ATCC15698 中分离得来, Bourget 等<sup>[8]</sup>已建立了该质粒的限制性内切酶图谱, 并对该质粒在菌体内的复制方式进行研究, 由于在质粒复制过程中没有检测到单链环状 DNA, 因此推测该质粒在菌体内是以  $\theta$  复制方式进行复制而不是滚环复制。

pMB1 质粒是从长双歧杆菌 B257 菌株中分离出的隐性质粒, 该质粒已有限制性内切酶图谱。对其复制区域的研究也已开始, Matteuzzi 等<sup>[9]</sup>将 pMB1 质粒酶切后连接到质粒载体上, 再转化大肠杆菌以及枯草杆菌, 结果只有在大肠杆菌中检测到重组子, 由于所使用载体的复制区域只能在大肠杆菌而不能在革兰氏阳性菌中启动, 因而说明该隐性质粒的复制区域不能在枯草杆菌中启动。有关双歧杆菌质粒的复制机制还有待进一步深入研究, 该研究将为最终建立以双歧杆菌为克隆宿主的质粒载体打下基础。

穿梭质粒是能在两种或两种以上宿主中复制的质粒, 以大肠杆菌为宿主, 有利于转化和重组子的筛选, 并能增加所需 DNA 克隆片段的检出率, 如果克隆载体也能在所研究菌株中复制, 那么就可以检验所克隆片段在天然宿主中基因表达的作用。Missich 等<sup>[10]</sup>成功地构建了一个大肠杆菌——长双歧杆菌的穿梭载

\* 获福建省自然科学基金课题资助。

\*\* 通讯联系人

体。将 pMB1质粒经限制性酶切和连接酶作用,在体外与 pGEM-5zf(+ )质粒重组,形成 pRM1重组质粒, pMB在体外连接上一个 Sp<sup>r</sup>基因而构成 pRM2重组质粒,将该重组质粒分别转化为大肠杆菌和双歧杆菌,均筛选到重组子,说明 pRM2重组质粒为穿梭载体。但该穿梭载体转化大肠杆菌与双歧杆菌的效率不同,对双歧杆菌转化效率还有待于提高。大肠杆菌——双歧杆菌穿梭载体的成功构建,将为今后双歧杆菌的遗传分子机理的研究和基因工程菌的研制提供有力的工具。

除在球双歧杆菌中发现有与四环素抗性有关的质粒外<sup>[4]</sup>,在双歧杆菌中检出的质粒多是隐性质粒。Mattarelli等<sup>[11]</sup>曾通过总蛋白质电泳分析来探讨球双歧杆菌质粒可能编码的表型特征,但未有进一步报道。因此,对于质粒所编码的基因,质粒在双歧杆菌代谢生理中的作用,以及质粒本身的特征(包括质粒结构、复制、接合转移、拷贝控制、不相容性和质粒分离等),都是今后研究的重要课题。

### 3 双歧杆菌染色体组的研究

有关双歧杆菌染色体组的研究目前报道不多。新发展的 PFGE(脉冲场凝胶电泳)技术,使得人们可以在分子水平研究染色体组的结构与功能,确切计算染色体 DNA 分子的长度及其变化。Bourget等<sup>[8]</sup>将来自短双歧杆菌的五个菌株的 DNA,经不同限制性酶酶切后进行脉冲电泳,从电泳图谱可以看出,这五株菌具有较多相同的谱带,说明该五株菌属于同一个种,这与 DNA-DNA 杂交实验的结果相同。电泳图谱也显示了不同菌株间的多态性,这些多态性可以用于鉴别不同菌株以及分析各菌株的亲缘关系。此外实验还发现采用高频率酶和低频率酶进行酶切,其显示的多态性,后者要多于前者,从而可以推测,短双歧杆菌菌株间 DNA 的多态性主要源于染色体组大的变化,如易位和倒位。这暗示了这些菌株是通过广泛的染色体组重排而从同一个原始菌趋异进化而来。通过 PFGE电泳图谱还对短双歧杆菌的染色体组大小进行了估计,各菌株大小相近,约为 2.1Mb<sup>[12]</sup>。此外,以 rRNA 基因为探针,检测短双歧杆菌染色体组上的,rrn 位点

数,还发现该菌染色体上至少有 3 个 rrn 位点<sup>[8]</sup>。

### 4 双歧杆菌的分子分类

将双歧杆菌独立为一个属是双歧杆菌分类研究所取得的重要成果。然而长期以来,双歧杆菌属内各种或亚种主要根据生化反应来鉴定<sup>[13,14]</sup>,这种鉴定法产生了许多分类上的误差,尤其是青春双歧杆菌和动物双歧杆菌的鉴定中<sup>[15]</sup>。蛋白质电泳图谱<sup>[16]</sup>以及随后出现的 DNA-DNA 杂交技术<sup>[17,18]</sup>为双歧杆菌种间的遗传关系提供了更准确的估计。而从分子水平,采用如 rRNA 基因序列分析、RELP 以及 RAPD 等技术将使快速、准确而又简单地进行双歧杆菌的鉴定成为可能。

#### 4.1 rRNA 基因序列分析

rRNA 是细胞内核糖体的主要组成部分,在细胞中具有较高拷贝数和较为保守的基因结构,利用某些高度保守的区域,可设计出寡聚核苷酸引物,即所谓的通用引物,这些引物与几乎所有细菌的相应区域相似或互补。在细菌中,rRNA 可分为三类 5s 16s 23s。采用不同的 rRNA,其分析鉴定的途径不同,但所用方法都是建立在 rRNA 或 rDNA 的核苷酸顺序的比较上<sup>[19]</sup>。

Ludwig 等<sup>[20]</sup>依据大肠杆菌 16srRNA 的保守序列,合成出两个分别为 19 和 16 个碱基对的引物,采用 PCR 扩增技术从分叉双歧杆菌的 DNA 中扩增出一段长 1541 个碱基对的 rDNA 片段,经测序后,与大肠杆菌及一些革兰氏阳性菌进行比较,发现分叉双歧杆菌与大肠杆菌的碱基相似性为 79.8%,与 *Streptomyces coelicolor* 为 76.0%,而与人口腔中的放线菌,如内氏放线菌相似性为 88.5%,粘性放线菌为 88.7%。这表明了双歧杆菌与口腔中的放线菌具有较近的亲缘关系。

种特异性寡聚核苷酸探针应用于分类学,使双歧杆菌菌种的鉴定更为方便和迅捷。Yamamoto 等<sup>[21]</sup>从五株分别代表五个种的双歧杆菌的 rRNA 中,找到了相应的五个种特异性片段作为探针,采用原位杂交的方法对 61 株双歧杆菌进行了分类和鉴定,结果认为,这些寡聚核苷酸探针具有相当好的种特异性和灵

敏度。

#### 4.2 RELP技术

由于 DNA片段中限制性内切酶识别序列内的点突变或由于插入、缺失或颠换等分子事件,引起了 DNA片段限制性位点的改变,使利用限制性内切酶切割 DNA所得片段的长度发生变化,从而导致出现限制性片段长度的多态性(RFLP)。RFLP除了用于 DNA序列的直接比较外,还是检测种内或种间 DNA水平差异最敏感的工具之一。作为分子水平的遗传标志,RFLP是 DNA序列多态性的直接反映。由于 RFLP作为遗传标志的显著优点,引起众多遗传学家及分类学家的极大兴趣。

近几年,RFLP技术也已应用于双歧杆菌的鉴定及分类,Mangin等<sup>[15]</sup>以 23srDNA的片段 I41为探针,采用 RFLP技术,对 21株已知双歧杆菌进行分类和鉴定。根据 RFLP可将 21株菌分为八个种,这与传统分类结果相同。采用不同限制性内切酶,RFLP所显示的带型不同,但各个种都有各自共同的谱带,根据共同谱带可将各菌株归类与同一个种。同时,RFLP还显示了各菌株间的 DNA差异,这使得 RFLP可作为种以下菌株间的鉴定,并成为跟踪双歧杆菌在肠道中分布及行为的一种手段。因此,Mangin等以 RFLP带型为鉴别标记,跟踪了在抗生素治疗中,外源具抗药性的长双歧杆菌导入人体后的定植情况,结果发现在该实验条件下,外源长双歧杆菌并不能在肠道中定植。

#### 5 展望

目前,国外双歧杆菌的遗传学研究已有良好的开端,国内的研究还有待于加强。笔者认为,今后,双歧杆菌分子生物学与遗传学研究的重点应放在:1.继续对双歧杆菌遗传背景(包括质粒、染色体组)进行研究;2.注重双歧杆菌在微生态环境中的遗传学研究,探讨双歧杆菌在消化道定植的分子机理,双歧杆菌与其它菌群之间是如何相互作用的,以及双歧杆菌与其它消化道细菌(包括外来致病菌)间质粒的接合转移机制等;3.重视双歧杆菌的应用研究,采用基因工程技术开发基因工程菌,或对已有的生产菌株进行遗传改造,提高代谢活性

和益生活性,将遗传学基础研究的成果,用于医疗和保健中。

#### 参考文献

- [1] 康白. 微生物学,大连出版社,1988
- [2] 康白. 中国微生物学杂志, 1994;6(1): 45
- [3] 苏文金. 中国微生物学杂志, 1991;2(4): 72
- [4] Sgorbati B, et al. J Gen Microbiol, 1982; 128: 2121
- [5] Iwata M, et al. Lett Appl Microbiol, 1989; 9: 165
- [6] Sgorbati B, et al. Microbiologica, 1986; 9: 443
- [7] Sgorbati B, et al. Microbiologica, 1986; 9: 415
- [8] Bourget N, et al. FEMS Microbiol Lett, 1993; 110: 11
- [9] Matteuzzi D, et al. Lett Appl Microbiol, 1990; 11: 220
- [10] Missich R, et al. Plasmid, 1994; 17: 327
- [11] Mattarelli P. Microbiologica, 1994; 17: 327
- [12] Le Bourgeois P, et al. Genetics and Molecular Biology of Streptococci, Lactococci and Enterococci, American Society for Microbiology, 1991, pp. 140
- [13] Mitsuoka T. Bifidobacteria and Microflora, 1984; 3: 11
- [14] Roy D and Ward P. J Appl Bacteriol, 1990; 69: 739
- [15] Mangin I, et al. Appl Environ Microbiol, 1994; 80: 1451
- [16] Biavati B, et al. Int. J. Syst. Bacteriol, 1982; 32: 358
- [17] Biavati B. and Mattarelli P. Int J Syst Bacteriol, 1991; 41: 163
- [18] Bahaka D, et al. Int J Syst Bacteriol, 1993; 43: 565
- [19] Olsen GJ, et al. Ann Rev Microbiol, 1986; 40: 337
- [20] Ludwig W, et al. Int J Syst Bacteriol, 1992; 42: 161
- [21] Yamamoto T, et al. Appl Environ Microbiol, 1992; 58: 4076

(收稿日期: 96-1-3)