

双歧杆菌定量分析技术研究进展

陈津津, 蔡威

陈津津, 蔡威, 上海交通大学医学院附属新华医院临床营养中心 上海市 200092

陈津津, 2004年上海交通大学医学院博士生, 主治医师, 主要从事胃肠道微生态的研究。

国家自然科学基金资助项目, No. 30271350

通讯作者: 陈津津, 200092, 上海市控江路1665号, 上海交通大学医学院附属新华医院临床营养中心. jivoo@163.com

电话: 021-65790000

收稿日期: 2006-02-06 接受日期: 2006-02-21

摘要

传统细菌培养计数法是依据细菌表型特征来对双歧杆菌进行鉴别计数的, MTPY和BSM培养基是经常使用的双歧杆菌培养基. 近年来包括点杂交、荧光原位杂交、荧光原位杂交结合流式细胞计数和荧光实时定量PCR技术在内的以核糖体及其编码基因核酸序列为鉴别基础的分子生物学技术被广泛用于双歧杆菌的定量定性分析, 其中荧光原位杂交结合流式细胞计数和荧光实时定量PCR技术是目前较为理想的方法。

关键词: 双歧杆菌; 定量分析; 计数; 杂交

陈津津, 蔡威. 双歧杆菌定量分析技术研究进展. 世界华人消化杂志 2006;14(11):1077-1080

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/1077.asp>

0 引言

双歧杆菌(*Bifidobacterium*)是1899年由法国巴斯德研究所的Tissier首次从母乳喂养的婴儿粪便中分离发现的, 作为恒温动物肠道内重要的原籍菌群, 他与其他生理性细菌成员一起构成了一个微生物群落, 并与宿主构成一个微生态系统, 发挥维持微生态平衡、生物拮抗、免疫调节、营养等多方面的生理作用. 对人类而言, 他不仅能维持肠道的微生态平衡, 还能提高人体对乳糖的耐受性, 具有降血脂、抗肿瘤的作用, 并能合成多种维生素, 促进机体免疫机能, 是最重要的益生菌之一, 其在肠道内的总数量反应了机体肠道微生态状况和机体的健康状况. 因此对肠道内或食品中的双歧杆菌进行准确地定量分析, 对于医疗卫生和营养保健方面的研究

具有重要意义. 双歧杆菌定量分析的方法主要分为传统计数法和分子生物学定量分析法.

1 传统计数法

细菌培养加菌落计数是双歧杆菌定性定量的一种传统计数方法, 主要是依据细菌表型特征通过特殊培养基接种培养、菌株计数而实现. 由于双歧杆菌属于革兰氏阳性厌氧菌, 无孢子形成, 不能游动, 无氧化脱氢酶, 形态多变, 对酸敏感, 对营养要求苛刻, 其生长所需的氮源需有酪蛋白降解产生的肽和氨基酸, 所需的碳源大多由人体不能利用的寡糖提供, 且与其他乳酸菌如嗜酸乳杆菌、德氏乳杆菌、保加利亚乳杆菌及嗜热链球菌具有相近的生长特点, 使双歧杆菌的培养和鉴别存在很大难度.

当待测样品中仅含有双歧杆菌时, 其计数可在葡萄糖血肝培养基(glucose-blood-liver, GBL)、强化梭菌培养基(reinforced clostridial agar, RCA)和脑心浸液培养基(brain-heart infusion, BHI)等培养基中进行^[1]. 然而大多情况下, 待测样品中往往混合了多种细菌, 此时必须利用选择性鉴别培养基来对双歧杆菌进行鉴别计数, 各种细菌不同的氧耐受性、营养要求、抗生素敏感性以及菌落的形态和颜色特征构成了鉴别的基础. 在以往众多的选择性鉴别培养基中, 应用效果较好的主要有: 1978年Teraguchi *et al*^[2]将新霉素-巴龙霉素-萘啶酮酸-氯化锂培养基(neomycin-paromomycin-nalidixic acid-lithium chloride, NPNL)用于双歧杆菌的选择计数, 该培养基在后来双歧杆菌计数培养基的发展中一直作为一种参考培养基. 其后, Lapierre *et al*^[3]设计的氯化锂-丙酸钠培养基(lithium chloride-sodium propionate, LP)及Lim *et al*^[4]研制的葡萄糖-血肝-牛胆汁-庆大霉素培养基(glucose-blood-liver-oxgall-gentamycin, GBL-OG), 在发酵乳制品中选择计数双歧杆菌时也得到较好的结果, 1999年Rhodes *et al*^[5]研究的在半乳糖基质中同时计数双歧杆菌及其他乳酸菌的方法也比较好. 近

■背景资料

双歧杆菌(*Bifidobacterium*)是最重要的益生菌之一, 对肠道内或食品中的双歧杆菌进行准确地定量分析, 对于医疗卫生和营养保健方面的研究具有重要意义. 由于双歧杆菌的传统培养计数法存在培养条件苛刻, 计数不准确, 因此目前应用分子生物学技术对其进行定量分析成为该研究领域的热点. 本文针对目前双歧杆菌定量分析方法进展迅速、方法多样, 但各存利弊、在应用上缺乏统一标准, 故广泛查阅了ISI、PubMed等所收录的近年来检测双歧杆菌的所有相关文献, 对其整理分类后作一综述, 期望有助于相关研究中对双歧杆菌定量方法应用的选择.

■同行评价

双歧杆菌由于参与构成宿主生态系统,发挥维持微生态平衡、免疫调节、营养等多方面的生理作用,其在肠道内的总数量反应了机体肠道微生态状况和机体的健康状况。因此对肠道内或食品中的双歧杆菌进行准确地定量分析,对于医疗卫生和营养保健方面的研究具有重要意义。本文,选题明确,较详细的综述了人类双歧杆菌定量分析方法,所引用的参考文献较新,文章内容有一定的科学参考价值和可读性,基本能反映国内外双歧杆菌定量方法研究动态。

年改良的TPY培养基(modified TPY, MTPY)^[6]和在MRS培养基中添加盐酸半胱氨酸的BSM培养基(bifidobacteria selective medium, BSM)^[7]因对双歧杆菌的选择性较强、培养阳性率较高而经常使用。以上各种培养基主要是用于食品或发酵乳制品中双歧杆菌菌种的培养,如长双歧杆菌(*B. longum*)、短双歧杆菌(*B. breve*)、婴儿双歧杆菌(*B. infantis*)、青春双歧杆菌(*B. adolescentis*)、两双歧杆菌(*B. bifidum*)等,而正常人体还包括了一些不能由这些培养基鉴别计数的双歧杆菌的其他菌种,如球双歧杆菌(*B. globosum*)、链双歧杆菌(*B. catenulatum*)、假链双歧杆菌(*B. pseudocatenulatum*)、角双歧杆菌(*B. angulatum*)等,同时培养基中添加的抗生素对双歧杆菌本身也会有不同程度的抑制作用,而且特异性培养基只是相对特异^[8],到目前为止也没有一种完全理想的选择性培养基。这些原因使得传统的细菌培养法虽然能计数活菌,但费时、费力、培养难度大,其计数也不精确。

2 分子生物学定量分析法

传统细菌培养法的鉴别依据是基于细菌的形态学、生理学和生物化学特征,而这些特征仅仅是细菌在特殊培养条件下的特异表现,相反分子生物学定量分析法是以细菌基因组的核酸序列为鉴别基础,不易受外界环境因素的干扰,不依赖培养基性能,不受培养时间限制,使定量分析结果更稳定、更敏感、更省时,同时重复性更好^[9]。细菌细胞内核糖体数量达104-105,核糖体RNA(rRNA)又具有特异区和保守区之分,因此5S rRNA、16S rRNA和23S rRNA的指纹图谱和序列常被用作比较微生物学分类的方法。其中16S rRNA的序列达1500-12 000个核苷酸,其序列长度适中,兼有保守区和可变区之分,因此其序列资料常用于设计基因探针和PCR(多聚酶链反应)扩增引物。由于探针和引物具有高度敏感性和特异性,使其能在属、种、亚种甚至株等各个水平上对细菌进行鉴别计数。目前用于双歧杆菌定量分析的分子生物学技术主要有点杂交(dot blot hybridization)、荧光原位杂交(fluorescence *in situ* hybridization, FISH)、荧光原位杂交结合流式细胞计数(FISH combined with flow cytometry)和荧光实时定量PCR技术(real-time quantitative PCR, real-time Q-PCR)。

2.1 点杂交(dot blot hybridization) 进入1990年代

后,以16S rRNA为目标基因的寡核苷酸探针杂交技术被广泛用于细菌的定性定量分析^[10]。该技术由两部分组成。(1)合成的寡核苷酸探针能与细菌核糖体基因的特殊区域互补杂交,使其具有鉴别的特异性;(2)探针末端用特殊物质进行标记,这些标记物又可分为具有放射活性的热标,如^[32P]ATP、异硫氰酸荧光素(FITC)等,和不具放射活性的冷标,如共价键结合的报告酶或通过间接标记的半抗原抗体等,然后通过特定设备对标记物产生的放射活性、荧光数值、酶活性或比色反应数值的测定来实现定量的目的^[11]。点杂交和荧光原位杂交是主要的两种用于双歧杆菌定量分析的寡核苷酸探针杂交技术。

Seksik *et al*^[12]用6种不同细菌属的以16S rRNA为目标基因的特异寡核苷酸探针,同时与克隆病患者粪便中和正常人粪便中提取的RNA进行点杂交,发现克隆病患者肠道内的双歧杆菌和梭菌数量、活性较正常人组明显下降。同样的技术也应用于年龄、疾病与相关肠道菌群结构变化的研究^[13]中,研究指出随年龄的增长,肠道内双歧杆菌的数量、所占比例明显下降,同时罹患疾病的风险显著增加。Dore *et al*^[14]、Sghir *et al*^[15]和Marteau *et al*^[16]在各自的研究中也用点杂交技术对双歧杆菌进行了定量。点杂交技术是以细胞内杂交的rRNA量来反应细菌数量,其优点在于rRNA数量能反应细胞的生理活性,然而不同的细菌细胞内或同一细菌不同生长期细胞内所含的rRNA数量有变异,所以用以16S rRNA为目标基因的点杂交进行细菌定量只是一种相对定量,其结果具有局限性。针对上述缺点,目前以rDNA即编码16S rRNA的基因序列为目标基因的点杂交技术在计数双歧杆菌时,避免了核糖体数量变异的影响,取得了较好的效果^[17]。

2.2 荧光原位杂交(fluorescence *in situ* hybridization, FISH) 与点杂交、反斑点杂交和克隆杂交等杂交技术不同,荧光原位杂交虽然也是以16S rRNA为目标基因,但其无需提取RNA,而是在待测样品中直接加入荧光探针,其荧光显像是一个细胞、一个细胞为基础,从而可在荧光显微镜下对原位细胞内的rRNA量和代谢活性有直观了解,并在荧光显微镜下进行细菌计数。1995年Langendijk *et al*^[18]首次报道了用荧光原位杂交法测定成人肠道细菌数量,发现双歧杆菌数量只占细菌总量的2%,远较以往10%的结论

要低. 其后由于荧光原位杂交操作方法简易、定量精确和检测敏感特异, 而被广泛用于乳制品^[19]和肠道中^[20-24]包括双歧杆菌在内的各种细菌的定量检测.

2.3 荧光原位杂交结合流式细胞计数(FISH combined with flow cytometry) 由于荧光显微镜下的细菌计数耗时较长, 目前又出现了以荧光原位杂交结合流式细胞计数的方法对双歧杆菌进行快速、自动的计数. 由于该方法结合了FISH的简易、直观和流式细胞仪计数快捷的优点, 使他在近几年内成为医学研究实践中常用的方法之一. 2004年一项抗生素对肠道菌群影响的实验室研究^[25]和同年Fergus *et al*^[26]在炎症肠病的研究中都采用了此法对双歧杆菌进行定量分析, 取得了较理想的结果. 在应用益生菌治疗肠道感染的一项研究中^[27]也提示了相同的结论.

2.4 荧光实时定量PCR技术(real-time quantitative PCR, real-time Q-PCR) 多聚酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)技术的出现虽然只有20 a, 但他及其衍生技术已成为分子生物学实验研究最重要的手段之一. 在近几年对双歧杆菌的各种研究中已涉及PCR、多重PCR(multiplex PCR)、扩增核糖体DNA限制性分析(amplified ribosomal DNA restriction analysis, ARDRA)、变性梯度凝胶电泳(denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE)和荧光实时定量PCR(real-time Q-PCR)等多种PCR技术. 其中real-time Q-PCR是指在PCR反应体系中加入荧光基团, 利用荧光信号累积实时监测整个PCR进程, 最后通过标准曲线对未知模板进行定量分析的方法. 他实现了PCR从定性到定量的飞跃, 并以其特异性强、灵敏度高、重复性好、定量准确、速度快、全封闭反应等优点成为双歧杆菌定量分析的重要方法. 2004年Gueimonde *et al*^[28]在测定不同年龄正常人类粪便中双歧杆菌的数量时, 分别使用了real-time Q-PCR和FISH两种技术, 结果发现两者在双歧杆菌高浓度水平时都能进行精确定量, 且结果具有良好的相关性, 而在低浓度水平时, real-time Q-PCR的测定更敏感也更精确, 其最低检测水平可达 5×10^4 /g. 在比较real-time Q-PCR和点杂交定量粪便细菌的研究^[17]中发现, real-time Q-PCR的敏感性远高于点杂交, 且操作更简易, 更快速. Haarman *et al*^[29]用real-time Q-PCR方法进行的研究发现, 食用添加益生源配方奶粉的婴儿, 其肠道内双歧杆菌的总量较食用标准

配方奶粉的婴儿明显升高, 且双歧杆菌的菌种构成也与母乳喂养的婴儿相仿. Bartosch *et al*^[30]在对老年人肠道菌群结构变化的研究中也使用了real-time Q-PCR定量技术, 发现双歧杆菌等益生菌数量与年龄、饮食和抗生素治疗密切相关.

总之, 从传统细菌培养法到利用分子生物学技术进行定量分析, 整个定量分析技术逐渐向高精度度、高敏感度、高重复性和高效率发展.

3 参考文献

- 1 Dave RI, Shah NP. Evaluation of media for selective enumeration of *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus*, and *bifidobacteria*. *J Dairy Sci* 1996; 79: 1529-1536
- 2 Teraguchi S, Uehara M, Ogasa K, Mitsuoka T. Enumeration of *bifidobacteria* in dairy products (author's transl). *Nippon Saikingaku Zasshi* 1978; 33: 753-761
- 3 Lapierre L, Undeland P, Cox LJ. Lithium chloride-sodium propionate agar for the enumeration of *bifidobacteria* in fermented dairy products. *J Dairy Sci* 1992; 75: 1192-1196
- 4 Lim KS, Huh CS, Baek YJ, Kim HU. A selective enumeration medium for *bifidobacteria* in fermented dairy products. *J Dairy Sci* 1995; 78: 2108-2112
- 5 Rhodes MW, Kator H. Sorbitol-fermenting *bifidobacteria* as indicators of diffuse human faecal pollution in estuarine watersheds. *J Appl Microbiol* 1999; 87: 528-535
- 6 Rada V, Petr J. A new selective medium for the isolation of glucose non-fermenting *bifidobacteria* from hen caeca. *J Microbiol Methods* 2000; 43: 127-132
- 7 Leuschner RG, Bew J, Simpson P, Ross PR, Stanton C. A collaborative study of a method for the enumeration of probiotic *bifidobacteria* in animal feed. *Int J Food Microbiol* 2003; 83: 161-170
- 8 Wilson KH, Blitchington RB. Human colonic biota studied by ribosomal DNA sequence analysis. *Appl Environ Microbiol* 1996; 62: 2273-2278
- 9 Nissen H, Dainty R. Comparison of the use of rRNA probes and conventional methods in identifying strains of *Lactobacillus sake* and *L. curvatus* isolated from meat. *Int J Food Microbiol* 1995; 25: 311-315
- 10 Tannock GW. Analysis of the intestinal microflora: a renaissance. *Antonie Van Leeuwenhoek* 1999; 76: 265-278
- 11 Dattagupta N, Rae PM, Huguenel ED, Carlson E, Lyga A, Shapiro JA, Albarella JP. Rapid identification of microorganisms by nucleic acid hybridization after labeling the test sample. *Anal Biochem* 1989; 177: 85-89
- 12 Seksik P, Rigottier-Gois L, Gramet G, Sutren M, Pochart P, Marteau P, Jian R, Dore J. Alterations of the dominant faecal bacterial groups in patients with Crohn's disease of the colon. *Gut* 2003; 52: 237-242
- 13 Hopkins MJ, Sharp R, Macfarlane GT. Age and disease related changes in intestinal bacterial populations assessed by cell culture, 16S rRNA

- abundance, and community cellular fatty acid profiles. *Gut* 2001; 48: 198-205
- 14 Dore J, Sghir A, Hannequart-Gramet G, Corthier G, Pochart P. Design and evaluation of a 16S rRNA-targeted oligonucleotide probe for specific detection and quantitation of human faecal *Bacteroides* populations. *Syst Appl Microbiol* 1998; 21: 65-71
- 15 Sghir, A., Dore, J., and Mackie, R. I. Molecular diversity and phylogeny of human colonic bacteria. In: *Microbial Biosystems: New Frontiers*, Proceedings of the 8th International Symposium on Microbial Ecology. Bell CR, M. Brylinsky, P. Johnson-Green, eds. Atlantic Canada Society for Microbial Ecology, Halifax, Canada. 1999 Available from: plato.acadiau.ca/isme/Symposium14/sghir.PDF
- 16 Marteau P, Pochart P, Dore J, Bera-Maillet C, Bernalier A, Corthier G. Comparative study of bacterial groups within the human cecal and fecal microbiota. *Appl Environ Microbiol* 2001; 67: 4939-4942
- 17 Malinen E, Kassinen A, Rinttilä T, Palva A. Comparison of real-time PCR with SYBR Green I or 5'-nuclease assays and dot-blot hybridization with rDNA-targeted oligonucleotide probes in quantification of selected faecal bacteria. *Microbiology* 2003; 149: 269-277
- 18 Langendijk, P.S., Schut, F., Jansen, G.J., Raangs, G.C., Kamphuis, G., Wilkinson, M.H.F., and Welling, G.W. 1995. Quantitative fluorescence *in situ* hybridization of *Bifidobacterium* spp. with genus-specific 16S rRNA-targeted probe and its application in fecal samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 3069-3075.
- 19 Reuter G. Probiotics--possibilities and limitations of their application in food, animal feed, and in pharmaceutical preparations for men and animals. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 2001; 114: 410-419
- 20 Probert HM, Apajalahti JH, Rautonen N, Stowell J, Gibson GR. Polydextrose, lactitol, and fructo-oligosaccharide fermentation by colonic bacteria in a three-stage continuous culture system. *Appl Environ Microbiol* 2004; 70: 4505-4511
- 21 Harmsen HJ, Gibson GR, Elfferich P, Raangs GC, Wildeboer-Veloo AC, Argaz A, Roberfroid MB, Welling GW. Comparison of viable cell counts and fluorescence *in situ* hybridization using specific rRNA-based probes for the quantification of human fecal bacteria. *FEMS Microbiol Lett* 2000; 183: 125-129
- 22 Huber I, Spanggaard B, Appel KF, Rossen L, Nielsen T, Gram L. Phylogenetic analysis and *in situ* identification of the intestinal microbial community of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). *J Appl Microbiol* 2004; 96: 117-132
- 23 Bruck WM, Kelleher SL, Gibson GR, Nielsen KE, Chatterton DE, Lonnerdal B. rRNA probes used to quantify the effects of glycomacropeptide and alpha-lactalbumin supplementation on the predominant groups of intestinal bacteria of infant rhesus monkeys challenged with enteropathogenic *Escherichia coli*. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2003; 37: 273-280
- 24 Swidsinski A, Loening-Baucke V, Lochs H, Hale LP. Spatial organization of bacterial flora in normal and inflamed intestine: a fluorescence *in situ* hybridization study in mice. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 1131-1140
- 25 Barc MC, Bourlioux F, Rigottier-Gois L, Charrin-Sarnel C, Janoir C, Boureau H, Dore J, Collignon A. Effect of amoxicillin-clavulanic acid on human fecal flora in a gnotobiotic mouse model assessed with fluorescence hybridization using group-specific 16S rRNA probes in combination with flow cytometry. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 1365-1368
- 26 Shanahan F. Host-flora interactions in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2004; 10 Suppl 1: S16-S24
- 27 Isolauri E, Kirjavainen PV, Salminen S. Probiotics: a role in the treatment of intestinal infection and inflammation? *Gut* 2002; 50 Suppl 3: III54-III59
- 28 Gueimonde M, Tolkkio S, Korpimäki T, Salminen S. New real-time quantitative PCR procedure for quantification of bifidobacteria in human fecal samples. *Appl Environ Microbiol* 2004; 70: 4165-4169
- 29 Haarman M, Knol J. Quantitative real-time PCR assays to identify and quantify fecal *Bifidobacterium* species in infants receiving a prebiotic infant formula. *Appl Environ Microbiol* 2005; 71: 2318-2324
- 30 Bartosch S, Fite A, Macfarlane GT, McMurdo ME. Characterization of bacterial communities in feces from healthy elderly volunteers and hospitalized elderly patients by using real-time PCR and effects of antibiotic treatment on the fecal microbiota. *Appl Environ Microbiol* 2004; 70: 3575-3581

电编 韩江燕 编辑 潘伯荣