



罗伊氏乳杆菌肠道分离株的遗传多样性研究

余中节, 赵洁, 宋宇琴, 孙志宏*

内蒙古农业大学乳品生物技术与工程教育部重点实验室, 农业农村部奶制品加工重点实验室, 内蒙古自治区乳品生物技术与工程重点实验室, 内蒙古 呼和浩特 010018

摘要: 动物体内定殖着丰富且多样的细菌, 其对宿主的健康发挥着举足轻重的作用。罗伊氏乳杆菌 (*Lactobacillus reuteri*) 是存在于动物肠道中的益生菌, 是研究肠道菌群与宿主进化关系的模式菌种。

【目的】以下载自 NCBI 的分离自猪、家禽类、人类、啮齿类动物的 116 株 *L. reuteri* 和分离自内蒙古锡林郭勒牛、羊和马肠道中的 16 株 *L. reuteri* 为研究对象, 解析 *L. reuteri* 不同分离株的遗传多样性和宿主特异性, 为 *L. reuteri* 的开发利用提供理论依据。【方法】利用 MLST 技术, 以 *ddl*、*pkt*、*leuS*、*gyrB*、*dltA*、*rpoA*、*recA* 共 7 个看家基因为研究靶点, 对 *L. reuteri* 分离株遗传多样性进行研究, 推演分离株与宿主生境的进化关系。【结果】132 株 *L. reuteri* 共划分为 63 个序列型, 6 个克隆复合体。等位基因序列重组分析发现, 在 *L. reuteri* 的进化中发生了个别的重组事件, eBURST、MSTree 分析表明不同分离源的 *L. reuteri* 分离株经历了不同的进化过程, 系统发育分析表明 132 株 *L. reuteri* 来自 5 个 Clusters 且与分离源表现出较强的相关性。【结论】本研究利用 MLST 技术完成了 132 株 *L. reuteri* 肠道分离株的遗传多样性分析, 利用 MSTree、系统发育等群体结构分析, 发现不同分离源菌株有着高度的宿主特异性, 表明 *L. reuteri* 为适应不同生存环境经历了不同的进化过程。

关键词: 罗伊氏乳杆菌, 多位点序列分型技术, 肠道, 宿主特异性

在动物的肠道中存在着大量且多样的细菌^[1-2], 这些细菌在营养物质的利用、对病原菌的抵抗和免疫系统的成熟方面发挥着重要的作用^[3-4], 因此肠道菌群对宿主的健康有着巨大的贡献, 但不同宿主肠道中微生物间的遗传多样差异性鲜有报道。

多位点序列分型技术 (multi-locus sequence typing, MLST) 是根据细菌基因组中几个基因的多态性来区分不同菌株的分子生物学技术^[5-7], 因其具有操作简单、分辨率高、重复性好且可以在不同实验室完成菌株遗传多样性分析的优点, 而成为目前研究细菌群落结构分析最为成熟和稳

基金项目: 国家自然科学基金(31622043); 内蒙古自然科学基金(2016JQ04); 内蒙古农业大学杰出青年科学基金(2017XJQ-2)

*通信作者。Tel/Fax: +86-471-4301591; E-mail: sunzhihong78@163.com

收稿日期: 2018-08-28; 修回日期: 2019-02-21; 网络出版日期: 2019-03-26

定的方法之一。Maiden 等^[8]于 1998 年首次构建了用于研究脑膜炎奈瑟氏菌(*Neisseria meningitidis*)的 MLST 方案; de Las Rivas 等^[9]于 2004 年首次利用 MLST 技术选取不同酒类的 18 株酒球菌(*Oenococcus oeni*)的 5 个看家基因进行了研究, 结果表明 *Oenococcus oeni* 遗传多样性增加的主要因素是重组, 随后 MLST 被广泛应用于乳酸菌的遗传多样性分析。

益生菌一词最早来源于古希腊, 是指摄入适当剂量可以通过改善宿主肠道微生态或激发免疫系统活性进而对宿主产生有益作用的微生物^[10], 例如普拉梭菌(*Faecalibacterium prausnitzii*)的代谢产物丁酸盐是肠道上皮组织的主要营养来源^[11]。罗伊氏乳杆菌(*Lactobacillus reuteri*)作为益生菌的一种, 在中华人民共和国卫生部 2003 年颁布的第 3 号公告中被批准可用于保健食品的生产, 其几乎天然存在于所有的动物肠道中^[12-13], 可以调节肠道微生态, 拮抗有害菌的定殖, 并且可以产生一种广谱的非蛋白类抗菌物质——“罗伊氏菌素(reuterin)”, 可以抑制真菌、酵母、病原虫、

革兰氏阴性菌和革兰氏阳性菌的生长^[14], 同时也是人类肠道中与生俱来的菌种^[15], 故常被用于研究动物与其肠道菌群进化关系的模式菌种。本研究应用 7 个看家基因(*ddl*、*pkt*、*leuS*、*gyrB*、*dltA*、*rpoA*、*recA*)构建 MLST 方案分析了人类、家禽(鸡和火鸡)、啮齿类(大鼠和小鼠)、反刍类(牛和羊)、马和猪肠道中 *L. reuteri* 的种群结构, 以揭示该菌种在宿主肠道中的进化过程。

1 材料和方法

1.1 菌株选取

自内蒙古农业大学乳品生物技术与工程教育部重点实验室乳酸菌菌种资源库(Lactic Acid Bacteria Collection Center, IMAU)中选取 16 株(试验菌株)分离自动物肠道的 *L. reuteri*, 结合下载自 NCBI 的 GenBank 数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) Phaik 等^[16]构建的 116 株(下载菌株) *L. reuteri* 的 7 个看家基因的全部序列, 构建 132 株 *L. reuteri* 的 MLST 方案, 详细菌株信息见表 1。

表 1. *L. reuteri* 分离株 MLST 分析的看家基因及引物信息

Table 1. Housekeeping genes and primer information for MLST of *L. reuteri*

Locus	DNA coordinates on DSM20016 genome sequence	Fragment size/bp	Positive/negative chain (+/-)	Primer sequence (5'→3')	Primer length/bp	Annealing temperature/°C
<i>ddl</i>	530489-531119	633	+	ATTTCTTCTTCCCTGTTATCC	21	57
				TTCGTTCAAATCTTGTAATCC	22	
<i>pkt</i>	1747597-1747032	567	-	CACGAAGAAATGGCTAAGAC	20	55
				GTTGCGAAGAATCCGTGAC	19	
<i>leuS</i>	1342592-1342042	554	-	TACGACGCGGGCAGATAC	18	50
				ATAGAGATCAACTGGTGACC	20	
<i>gyrB</i>	5423-5946	526	+	AGAATTCCATTATGAAGGTGG	21	56
				TTCAACATTCAAGATCTTTCC	22	
<i>dltA</i>	289730-289199	534	-	TTGTCGATCATCAACAGCTTG	21	56
				CAGTTCGGTAAGCAGGCAC	19	
<i>rpoA</i>	1517154-1516656	499	-	CGGTTATGGAACCACTCTC	19	51
				AGCHGTTTCTGTAAATCAAC	21	
<i>recA</i>	583686-584211	528	+	TGAAAGTTCTGGTAAGACTAC	21	53
				CTTTTTAGCATTTCACGACC	21	

1.2 试验菌株所用材料和方法

1.2.1 菌株的活化与培养: 将保存于安瓿管中 16 株 *L. reuteri* 冻干菌粉取适量接种于 5 mL MRS 液体培养基, 在 37 °C 下恒温培养 24 h, 取适量菌液接种到新的 MRS 培养基中, 如此重复 2 次, 达到富集菌体的目的。

1.2.2 菌株 DNA 提取: 使用 TIANamp[®] Bacteria DNA Kit 细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取 16 株 *L. reuteri* 的总 DNA。

1.2.3 看家基因引物设计: 本研究参考 Phaik 等^[16] 构建的 MLST 方案选取 *ddl* (D-alanine-D-alanine ligase, D-丙氨酸-D-丙氨酸连接酶)、*pkt* (phosphoketolase, 磷酸酮酶)、*leuS* (leucyl-tRNA synthetase, 亮氨酸-tRNA 合成酶)、*gyrB* (DNA gyrase B subunit, DNA 促旋酶 B 亚基)、*dltA* (D-alanine-D-alanyl carrier protein ligase, D-丙氨酸-D-丙氨酸载体蛋白连接酶)、*rpoA* (RNA polymerase alpha subunit, RNA 聚合酶 α 亚基) 和 *recA* (recombinase, 重组酶) 共 7 个单拷贝看家基因作为 MLST 分型研究的候选基因, 其在 *L. reuteri* DSM20016 (NC_009513.1) 基因组序列上的位置以及相应引物信息如表 1, 引物由上海美吉生物医药科技有限公司合成。

1.2.4 看家基因 PCR 扩增和测序: 将 16 株 *L. reuteri* 提取的基因组 DNA 稀释至 100 ng/ μ L 作为 PCR 扩增模板。PCR 扩增条件为: 95 °C 预变性; 95 °C 变性 1 min, 退火 45 s (退火温度见表 1), 72 °C 延伸 1 min, 30 个循环; 72 °C 末端延伸 10 min。PCR 产物用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测, 并将扩增成功的产物送上海美吉生物医药科技有限公司测序。

1.3 数据分析

16 株试验菌株 7 个看家基因 PCR 扩增产物经

纯化、测序获得其相对应的核苷酸序列。通过 START v2.0 软件计算 132 株 *L. reuteri* 看家基因的非同义与同义置换速率比值(dN/dS)、G+C% 含量、等位基因数量(alleles numbers)和两两序列间位点的差异平均数(π , average pairwise nucleotide differences/site)。将序列导入 BioNumerics v6.6 软件识别相应菌株的看家基因的等位基因号, 确定 132 株 *L. reuteri* 的 ST 型, 并基于 Prim's 算法构建最小生成树(minimum spanning tree, MSTree), 获得各 ST 型与分离源间的关系。应用 eBURST v3.0 软件基于 BRUST 算法对 *L. reuteri* 分离株依不同基因型进行分组和聚类, 进而解析菌株之间的进化关系。利用 Linkage Analysis v3.7 (<http://guanine.evolbio.mpg.de/cgi-bin/lian/lian.cgi.pl/quer>) 计算等位基因标准相关系数 I_A^S (standardized index of association) 进行连锁平衡分析, 并采用 SplitsTree v4.0 软件评价重组事件对系统发育的影响, 构建重组分解分析图(split decomposition analysis), 并用该软件附带的 *phi*-test 检测等位基因内是否存在显著的重组现象。采用 MEGA v6.0 软件 Clustal W 算法进行看家基因序列进行了比对, 使用最大似然(maximum likelihood)算法构建了系统发育树, 自展重复抽样次数 1000 次, 对 132 株 *L. reuteri* 种群结构进行系统研究。

2 结果和讨论

2.1 MLST 分型研究

利用 START v2.0 共对 132 株 *L. reuteri* 的 7 个看家基因(*ddl*、*pkt*、*leuS*、*gyrB*、*dltA*、*rpoA*、*recA*) 序列进行了分析, 结果如表 2。7 个看家基因的扩增片段长度为 499 bp (*rpoA*)–633 bp (*ddl*), 串联序列总长度为 3841 bp。7 个看家基因等位基因个数

表 2. MLST 等位基因序列信息及多样性

Table 2. Allele sequence information and diversity of MLST

Locus	No. of alleles	(G+C) Content/%	d_N/d_S	π	ϕ -test
<i>ddl</i>	28	38.67	0.0099	0.02758	0.001447
<i>dltA</i>	34	39.99	0.0210	0.04783	2.17×10^{-15}
<i>gyrB</i>	26	41.97	0.0064	0.03674	1.23×10^{-9}
<i>leuS</i>	41	41.52	0.8923	0.09806	0.08296
<i>pkt</i>	29	44.04	0.1591	0.03258	0.38800
<i>recA</i>	23	39.06	0.0026	0.01854	0.10630
<i>rpoA</i>	17	39.42	0.0349	0.00687	0.98730

为 17–41, *leuS* 的等位基因数量最多, 为 41 个, 其次为 *dltA* 和 *pkt*, 分别为 34 和 29 个, *rpoA* 的等位基因数量最少, 为 17 个。7 个看家基因的 G+C% 含量为 38.67%–44.04%, 与模式菌株 *L. reuteri* DSM20016 有着相似 G+C% 含量, 表明这 7 个基因在 *L. reuteri* 的长期进化过程中保持了较高的保守性, 能真实地反映菌株间的进化关系。 d_N/d_S 为非同义替换与同义替换的比值, 常用来判断进化过程中基因是否受到选择压力的作用^[17], 若 $d_N/d_S > 1$ 表明基因在进化过程中存在正向选择压力; 若 $d_N/d_S < 1$ 则表明受到净化选择压力, 研究中 7 个看家基因的 d_N/d_S 的值为 0.0099(*ddl*)–0.8923(*leuS*), 均小于 1, 表明在长期的进化过程中所选看家基因受到更多进化选择的作用。 π 值表示两两序列间位点差异的平均数, 在 0 和 1 之间变化, 值越大表示变异程度越高^[18], 研究选取的 7 个看家基因的 π 值为 0.00687(*rpoA*)–0.09806(*leuS*), 表明等位基因位点的低突变率。综上所述, 本研究选取的 7 个看家基因符合看家基因在进化过程中较为保守的特点, 可以用于构建 MLST 方案, 能够准确反映出菌株之间的进化关系。

使用 BioNumerics v6.6 软件划分 132 株 *L. reuteri* 的序列型。132 株 *L. reuteri* 共划分为 63 个 STs 型, 表明 *L. reuteri* 具有较高的遗传多样性, 其中菌株数最多的 ST 型为 ST-1 (14 株菌), 分别

来自啮齿类、人类和家禽, 占总菌株数 10.6%, 其次含有菌株数最多的 ST 型为 ST-4 (13 株菌), 其余 ST 型包含的菌株为 2–9, 另外尚有 42 个 STs 型只包含 1 株菌, 占菌株总数的 31.82%。我们发现分离自不同样品的 *L. reuteri* 的 STs 大部分是不同的, 其中以啮齿类的多样性最高, 共形成 26 个 STs 型, 每个 ST 型分别包含 1–3 株菌; 分离自人类的菌株共包含 10 个 STs 型, 其中分离自人类分离株主要来自 ST-1 (11 株菌, 39.29%) 和 ST-5 (8 株菌, 28.57%); 分离自家禽和猪的菌株各包含 15 和 16 个 STs 型, ST-7 是家禽分离株的主要序列型, 共包含 4 株菌(15.38%), ST-4 是猪分离株的主要序列型, 共包含 10 株菌(25.00%); 分离自反刍动物和马的菌株共包含 3 个 STs 型, 其中 ST-45 是反刍动物分离株的主要序列型(7 株, 77.78%)。上述结果显示, 不同分离源的菌株有着不同的序列型, 但同一分离源的菌株的基因亦存在多样性, 表明这些 *L. reuteri* 分离株在不同的生存环境下经历了特定的进化历程, 即菌株在不同的生存环境下为了适应环境而导致的基因组多样性增加。

2.2 等位基因序列重组分析

使用 LIAN-linkage v3.7 软件分析了 7 个看家基因的重组情况^[19], 若等位基因间存在克隆结构, 则 I_A^S 显著不同于 0; 若等位基因间存在自由重组,

则 I_A^S 越接近于 0, 结果显示 7 个看家基因的 IAS 值为 0.025 ($P < 0.01$), 表明等位基因间存在明显的克隆结构, 即连锁不平衡, 而不是表现为等位基因间的自由组合。

为了进一步探究重组对 *L. reuteri* 种群结构的影响, 使用 SplitTree v4.0 软件进行了 Split decomposition 分析^[20], 结果如图 1-A 所示, *ddl* 呈现出了清晰的树枝状结构, 其余 6 个看家基因 (*pkt*、*leuS*、*gyrB*、*dltA*、*rpoA*、*recA*) 亦呈现出很少的平行四边形结构, 表明这些基因在进化过程中没有或仅经历了很少的基因间重组。*phi-test* 分析^[21] 7 个看家基因的串联序列, 未发现显著的重组现象 ($P = 0.0596$), 7 个看家基因 *phi-test* 分析的 P 值为 $2.17 \times 10^{-15} - 0.9873$ (表 2), 其中 *ddl*、*dltA*、*gyrB* 基因存在显著的重组现象, 其余 4 个看家基因均

未发现基因间的重组。紧接着, 使用 SplitTree v4.0 软件继续对 7 个看家基因的串联序列进行了分析, 如图 1-B 所示, 63 个 STs 型呈现出 5 个遗传谱系, 并且表现出一定的网状结构。综上, 表明 *L. reuteri* 分离株在进化过程中仅发生了个别重组事件。

2.3 eBURST 结果分析

eBURST 分析是根据 MLST 分析得到的序列型将分离株划分为相应的克隆谱系来研究其进化关系的一种生物信息学方法^[22]。本研究将至少包含 2 个 STs 型定义为一个克隆复合体 (clonal complex, CC)。由图 2 可知, 132 株 *L. reuteri* 的 63 个 ST 型共分为 6 个 CCs 和 41 个独特型 (singleton), 其中 6 个 CCs 包含 60 株菌, 占总菌株数的 45.45%。CC1 共包含 6 个 ST 型 24 株菌, 占有菌株的 18.18%, 为优势克隆复合体, ST-45

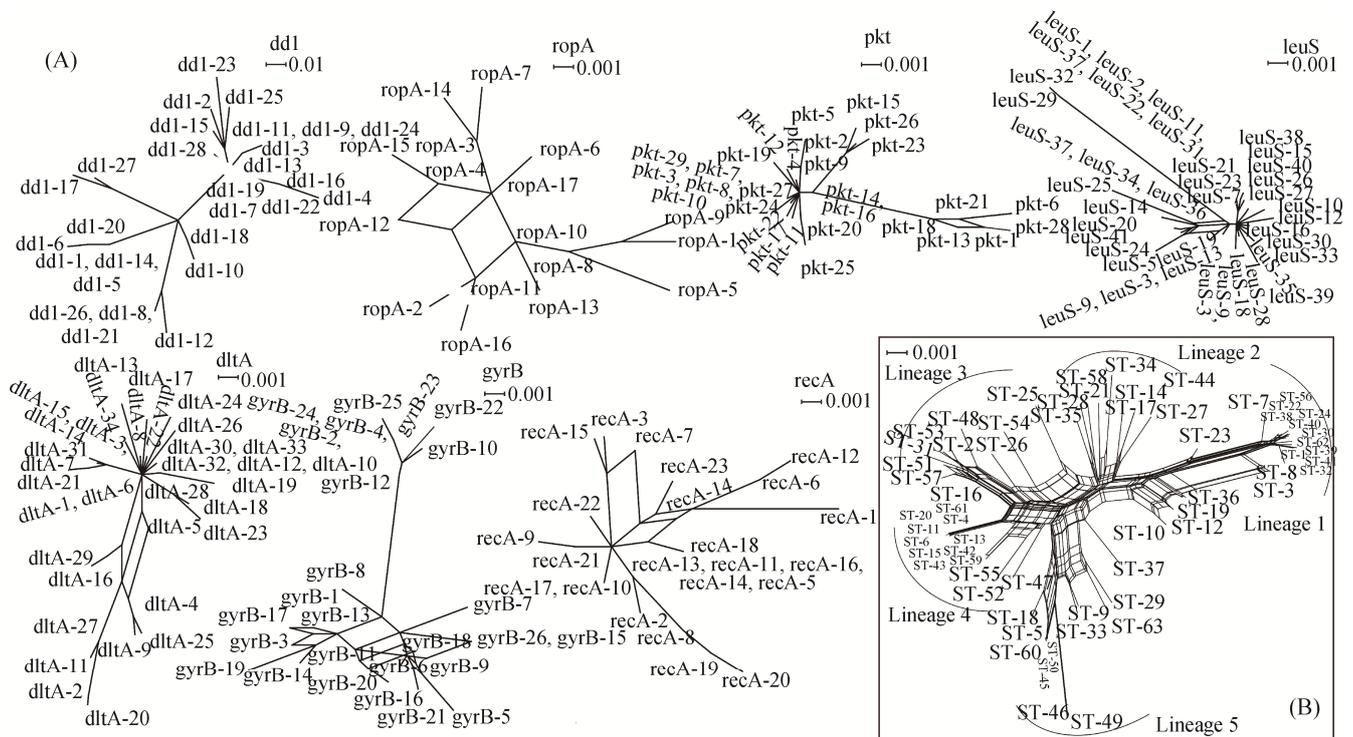


图 1. *L. reuteri* 等位基因重组分裂分解图(A) *L. reuteri* 串联序列重组分裂分解图(B)

Figure 1. split decomposition analysis of *L. reuteri* based on allele (A) split decomposition analysis of *L. reuteri* concatenate sequences (B).

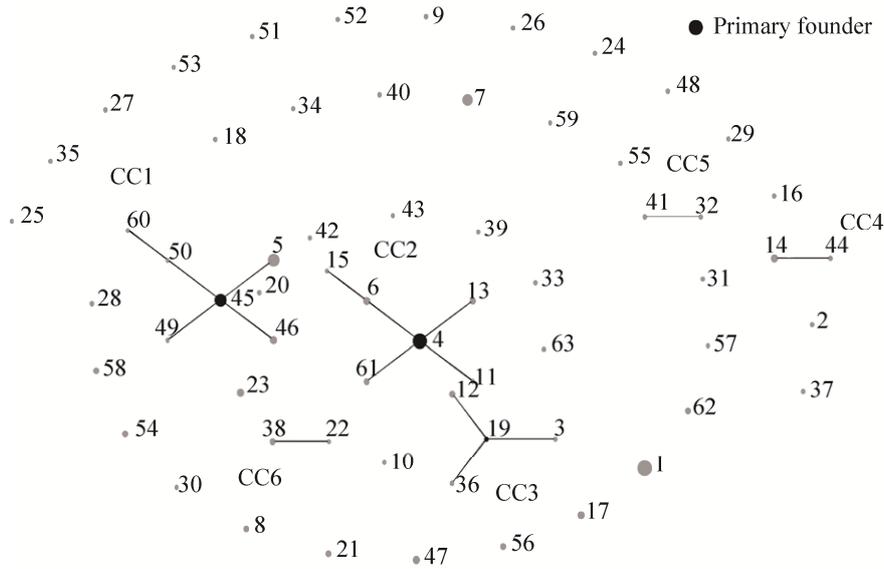


图 2. 63 个 STs 型 eBURST 分析
Figure 2. eBURST analysis of 63STs type.

包含有 4 个 SLV (只存在 1 个等位基因型不同的 ST 型), 且位于 CC1 的中心位置, 所以认为 ST-45 (分离自反刍动物) 为首要奠基者(primary founder), CC1 中的其他 ST 型是以 ST-45 为中心衍生出来, 因此 CC1 中分离自人类(10 株)、马(3 株)和猪(1 株)的菌株可能是由 ST-45 进化而来。CC2 由 6 个 ST 型构成, 共包含 22 株分离株, 其中分离自猪的菌株占 86.36% (19 株), ST-4 位于其中心位置, 是 CC2 的首要奠基者。CC3 包含 4 个 ST 型, 全部菌株均来自于猪, 其中 ST-19 为其首要奠基者, 推定其余菌株均由 cp395 菌株进化而来。CC4、CC5、CC6 均包含 2 个 ST 型, 其中 CC5 和 CC6 的菌株均分离自家禽, CC4 的菌株则分离自啮齿类。

2.4 不同序列最小生成树分析

为了进一步分析 *L. reuteri* 分离株的种群结构, 使用 BioNumerics v6.6 软件 Prim's 算法构建最小生成树(minimum spanning tree, MSTree)。以 *L. reuteri* 的不同分离源表示每个 ST 型节点的颜

色, 圆圈的大小表示该 ST 型包含菌株数量, 圆圈之间连线的虚实度代表亲缘关系的远近。如图 3 所示, 63 个 ST 型共形成 3 个分枝, 分枝 A 包含来自 CC2 和 20 个 STs 型的 46 株菌, 菌株主要分离自猪(23 株)和啮齿类(17 株); 分枝 B 的 11 株菌来自克隆复合体 CC4 和 5 个 STs 型, 菌株全部分离自啮齿类。分枝 C 包含 CC1、CC3 和 CC5 三个克隆复合体和 16 个 STs 型的 75 株菌, 菌株分离自人类(26 株)、家禽(25 株)、反刍类(10 株)和猪(7 株)。猪分离株集中在分枝 A, 啮齿类的分离株集中于分枝 A 和 B, 分离自人类、家禽和反刍类的菌株主要来自于分枝 C。eBURST 和 MSTree 两种进化分析方法表明不同分离源的 *L. reuteri* 分离株经历了不同的进化过程, 生存环境的差异在 *L. reuteri* 进化过程中扮演着重要的角色, 大多数相同分离源的 ST 型亲缘关系较近, 有较强的宿主特异性, 同时也出现个别菌株因为在宿主肠道内分化的时间不足而出现混入其他宿主亚群的情况。

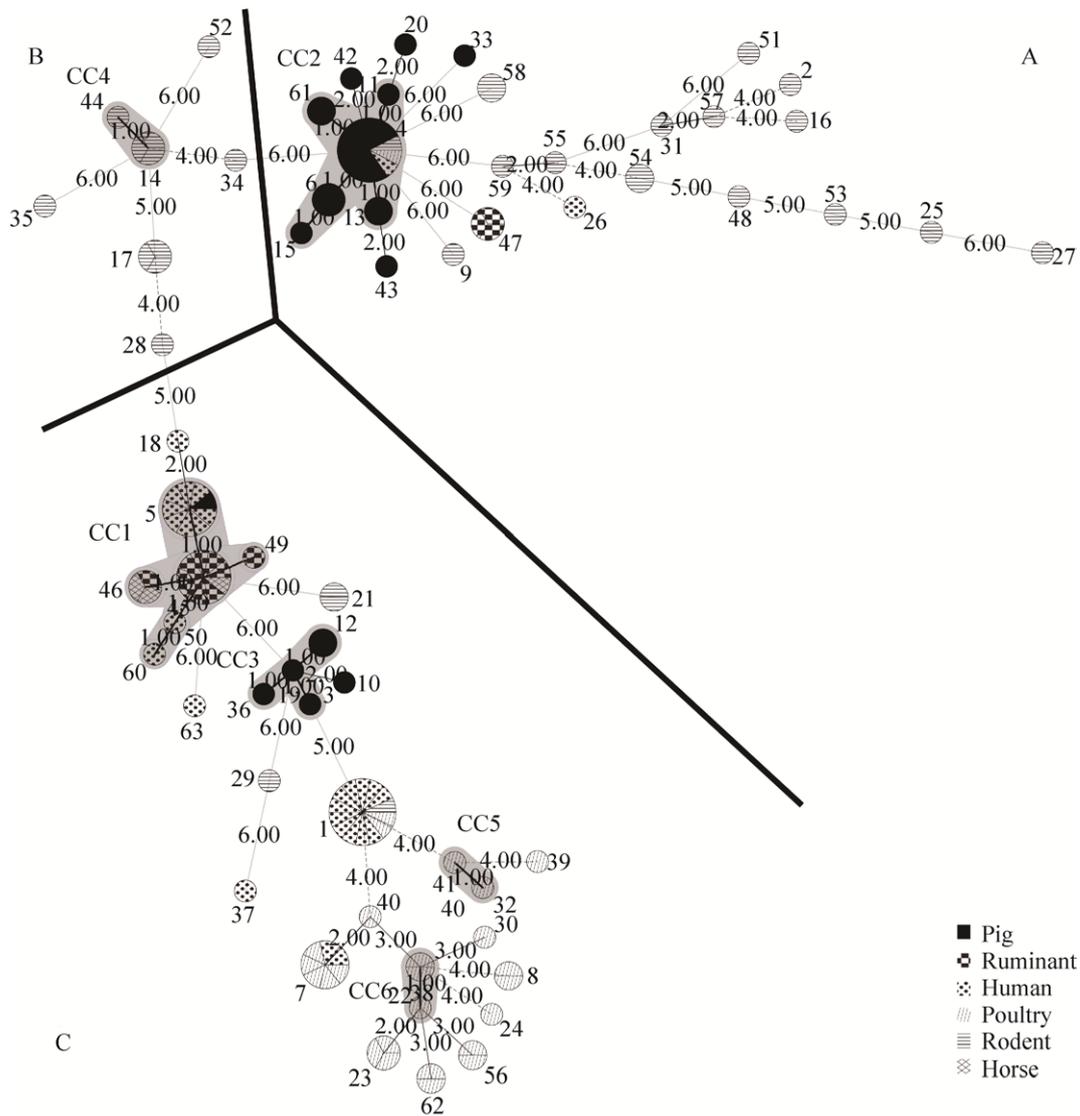


图 3. 132 株 *L. reuteri* 分离源最小生成树分析

Figure 3. Analysis of the minimum spanning tree of 132 *L. reuteri* separation sources.

2.5 *L. reuteri* 种群结构分析

为了更清晰阐明不同菌株间的进化关系，我们采用 Mega v6.0 软件的 Clustal W 算法对 132 株 *L. reuteri* 分离株的看家基因串联序列进行了比对，紧接着使用最大似然(maximum likelihood)算法构建了系统发育树，自展重复抽样次数 1000 次。结果如图 4 所示，132 株菌属于 5 个不同的类群。ClusterA 共包含两个亚群 35 株菌，AI 除菌株

lr85573 (人类)、ks6 (家禽)和 atcc55739 (啮齿类)外全部分离自猪，AII 共包含 10 株菌，全部菌株分离自啮齿类；ClusterB 共包含 2 个亚群 35 株菌，BI 的分离株主要来自反刍类和啮齿类，BII 则主要由马、人类和反刍类的分离株构成；ClusterC 仅包含 2 株菌，分别来自啮齿类和人类；ClusterD 包含 2 个亚群 23 株菌，DI 的菌株全部来自啮齿类，猪和家禽的分离株则构成了 DII；ClusterE 包

菌基因组多样性的认识。132 株菌共划分为 63 个 STs 和 5 个遗传谱系,发现大多数相同分离源的菌株有较近的亲缘关系,表明不同的生存环境对 *L. reuteri* 的进化发挥着重要的作用。

微生物和肠道宿主的共生关系与宿主的分类学地位和生存环境有着紧密的联系^[24],也就是说肠道微生物具有宿主特异性,例如,幽门螺旋杆菌(*Helicobacter pylori*)是一种微需氧、呈螺旋结构的革兰氏阴性菌,研究发现由于幽门螺旋杆菌对胃部的感染在人类中普遍存在,因而其可以被用于追踪人类的迁徙^[25];此外,鼠疫是由鼠疫耶尔森氏菌(*Yersinia pestis*)引起的一种烈性传染病,研究发现鼠疫的前两次大流行与郑和下西洋及丝绸之路有着紧密的联系^[26]。本研究中 7 个看家基因的 *dN/dS* 值均小于 1,表明在进化选择作用在所选基因中发挥了主导的作用,该结果与其他利用 MLST 进行乳酸菌遗传多样性研究结果一致^[27-28],原因可能为看家基因在进化过程中本身较为保守的特点^[29]。*L. reuteri* 是动物肠道中天然存在的益生菌^[12-13],其代谢产生的罗伊氏菌素是一种广谱的非蛋白类抗菌物质,可以抑制真菌、酵母、病原虫、革兰氏阴性菌和革兰氏阳性菌的生长^[14],提高宿主对环境的适应能力,进而使得 *L. reuteri* 能够长期定植在动物肠道内,但不同动物的肠道环境不同,对 *L. reuteri* 的进化发挥重要的作用。Bin 等^[30]通过细菌突变筛选,发现大肠杆菌产生的肠杆菌素(Ent)能提升宿主线虫体内的铁离子含量并促进其生长,这种利用共生菌代谢产物增加自身铁摄入对维持宿主体内铁稳态和共生都有重要意义。种群结构分析方面, MSTree 分离源关联分析则发现 63 个 ST 型共形成 3 个分枝,猪肠道分离株集中于分枝 A,啮齿类分离株集中于分枝 A

和 B,分离自人类、家禽和反刍类的菌株主要来自于分枝 C,表明 *L. reuteri* 分离株形成的分枝与分离源存在较强的相关关系, Sun 等^[31]利用 MSTree 分析发现瑞士乳杆菌遗传多样性的形成与所分离不同乳制品相关。进一步利用系统发育分析发现 132 株罗伊氏乳杆菌共分为 5 个不同的类群,猪肠道分离株集中于 ClusterAI,与 CC2 和 CC3 有相似的菌株构成, ClusterBII 主要由人类、反刍动物类和马肠道分离株构成,与 CC1 有相似的菌株构成,家禽分离株则几乎全部来自 ClusterEII,包含 CC5 和 CC6 中的菌株,啮齿类肠道分离株主要分布在 ClusterAII 和 ClusterDI。大多数相同分离源的菌株在进化树存在较近的亲缘关系, Yu 等^[32]对 37 株 *L. reuteri* 进行基因组重测序,系统发育分析发现源于不同宿主的 *L. reuteri* 进化历程各异,表明 *L. reuteri* 的遗传多样性与生存环境存在紧密的关联,然而,由于本研究仅包含 3 株马肠道分离株,对其与宿主关系解析尚不够充分。另外,在系统发育树中亦出现了不同分离源菌株相互混杂的情况, ClusterA 主要包含猪和啮齿类的肠道分离株, ClusterE 主要包含人类和家禽肠道的分离株,这表明目前的进化时间不足以形成真正的宿主特异性类群^[33];在某些宿主形成的特异性亚群中也混杂了其他宿主的分离株,例如,人类肠道分离株 mf14c 和 mf23 混杂在了家禽肠道分离株形成的亚群 ClusterEII 中,表明菌株通过宿主的饮食发生了菌株间基因重组,导致近期的宿主选择事件^[34], Split decomposition 分析发现 *L. reuteri* 分离株的进化过程中发生了重组事件,但 *phi-test* 未检测到显著的重组现象 ($P=0.0596$),推断低频重组并未成为 *L. reuteri* 进化的主要驱动力,同时 Savage 等^[35]的研究认为通

过这种重组形成的菌株只能短暂地存在于新宿主的肠道中, 而不能在宿主肠道中长期进化。

3 结论

L. reuteri 是动物肠道中天然存在的益生菌, 本研究利用 7 个与核心代谢相关的看家基因构建的 MLST 方案, 对来自不同动物肠道的 132 株 *L. reuteri* 肠道分离株的遗传多样性分析, 发现不同分离源菌株有着高度的宿主特异性, 表明 *L. reuteri* 为适应不同生存环境经历了不同的进化过程, 揭示了不同宿主 *L. reuteri* 肠道分离株的遗传背景, 为 *L. reuteri* 的开发利用提供理论依据。

参考文献

- [1] Hooper LV, Gordon JI. Commensal host-bacterial relationships in the gut. *Science*, 2001, 292(5519): 1115–1118.
- [2] Qin JJ, Li RQ, Raes J, Arumugam M, Burgdorf KS, Manichanh C, Nielsen T, Pons N, Levenez F, Yamada T, Mende DR, Li JH, Xu JM, Li SC, Li DF, Cao JJ, Wang B, Liang HQ, Zheng HS, Xie Y, Tap J, Lepage P, Bertalan M, Batto JM, Hansen T, Le Paslier D, Linneberg A, Nielsen HB, Pelletier E, Renault P, Sicheritz-Ponten T, Turner K, Zhu HM, Yu C, Li ST, Jian M, Zhou Y, Li YR, Zhang XQ, Li SG, Qin N, Yang HM, Wang J, Brunak S, Doré J, Guarner F, Kristiansen K, Pedersen O, Parkhill J, Weissenbach J, MetaHIT Consortium, Bork P, Ehrlich SD, Wang J. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature*, 2010, 464(7285): 59–65.
- [3] Tamburini S, Shen N, Wu HC, Clemente JC. The microbiome in early life: implications for health outcomes. *Nature Medicine*, 2016, 22(7): 713–722.
- [4] Marchesi JR, Adams DH, Fava F, Hermes GDA, Hirschfield GM, Hold G, Quraishi MN, Kinross J, Smidt H, Tuohy KM, Thomas LV, Zoetendal EG, Hart A. The gut microbiota and host health: a new clinical frontier. *Gut*, 2016, 65(2): 330–339.
- [5] Bihère E, Lucas PM, Claisse O, Lonvaud-Funel A. Multilocus sequence typing of *Oenococcus oeni*: detection of two subpopulations shaped by intergenic recombination. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75(5): 1291–300.
- [6] Jost BH, Trinh HT, Songer JG. Clonal relationships among *Clostridium perfringens* of porcine origin as determined by multilocus sequence typing. *Veterinary Microbiology*, 2006, 116(1/3): 158–165.
- [7] Ventura M, Canchaya C, Del Casale A, Dellaglio F, Neviani E, Fitzgerald GF, van Sinderen D. Analysis of bifidobacterial evolution using a multilocus approach. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2006, 56: 2783–2792.
- [8] Maiden MCJ, Bygraves JA, Feil E, Morelli G, Russell JE, Urwin R, Zhang Q, Zhou JJ, Zurth K, Caugant DA, Feavers IM, Achtman M, Spratt BG. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1998, 95(6): 3140–3145.
- [9] de Las Rivas B, Marcobal Á, Muñoz R. Allelic diversity and population structure in *Oenococcus oeni* as determined from sequence analysis of housekeeping genes. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70(12): 7210–7219.
- [10] Turnbaugh PJ, Gordon JI. The core gut microbiome, energy balance and obesity. *Journal of Physiology*, 2009, 587: 4153–4158.
- [11] Wang RF, Cao WW, Cerniglia CE. Phylogenetic analysis of *Fusobacterium prausnitzii* based upon the 16S rRNA gene sequence and PCR confirmation. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1996, 46(1): 341–343.
- [12] Savino F, Pelle E, Palumeri E, Oggero R, Miniero R. *Lactobacillus reuteri* (American Type Culture Collection Strain 55730) versus simethicone in the treatment of infantile colic: a prospective randomized study. *Pediatrics*, 2007, 119(1): e124–e130.
- [13] Weizman Z, Asli G, Alsheikh A. Effect of a probiotic infant formula on infections in child care centers: comparison of two probiotic agents. *Pediatrics*, 2005, 115(1): 5–9.
- [14] Chen FY, Lee MT, Huang HW. Sigmoidal concentration dependence of antimicrobial peptide activities: a case study on alamethicin. *Biophysical Journal*, 2002, 82(2): 908–914.
- [15] Reuter G. The *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* microflora of the human intestine: composition and succession. *Curr Issues Intest Microbiol*, 2001, 2(2): 43–53.
- [16] Oh PL, Benson AK, Peterson DA, Patil PB, Moriyama EN, Roos S, Walter J. Diversification of the gut symbiont *Lactobacillus reuteri* as a result of host-driven evolution. *The*

- Isme Journal*, 2010, 4(3): 377–387.
- [17] Jordan IK, Rogozin IB, Wolf YI, Koonin EV. Microevolutionary genomics of bacteria. *Theoretical Population Biology*, 2002, 61(4): 435–447.
- [18] Wu R, Wang LP, Wang JC, Li HP, Menghe B, Wu JR, Guo MR, Zhang HP. Isolation and preliminary probiotic selection of lactobacilli from koumiss in Inner Mongolia. *Journal of Basic Microbiology*, 2009, 49(3): 318–326.
- [19] Haubold B, Hudson RR. LIAN 3.0: detecting linkage disequilibrium in multilocus data. *Bioinformatics*, 2000, 16(9): 847–848.
- [20] Hillis DM, Bull JJ. An empirical test of bootstrapping as a method for assessing confidence in phylogenetic analysis. *Systematic Biology*, 1993, 42(2): 182–192.
- [21] Huson DH, Bryant D. Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. *Molecular Biology and Evolution*, 2006, 23(2): 254–267.
- [22] Feil EJ, Li BC, Aanensen DM, Hanage WP, Spratt BG. eBURST: inferring patterns of evolutionary descent among clusters of related bacterial genotypes from multilocus sequence typing data. *Journal of Bacteriology*, 2004, 186(5): 1518–1530.
- [23] Picozzi C, Bonacina G, Vigentini I, Foschino R. Genetic diversity in Italian *Lactobacillus sanfranciscensis* strains assessed by multilocus sequence typing and pulsed-field gel electrophoresis analyses. *Microbiology*, 2010, 156(7): 2035–2045.
- [24] Moran NA, McCutcheon JP, Nakabachi A. Genomics and evolution of heritable bacterial symbionts. *Annual Review of Genetics*, 2008, 42: 165–190.
- [25] Linz B, Balloux F, Moodley Y, Manica A, Liu H, Roumagnac P, Falush D, Stamer C, Prugnolle F, van der Merwe SW, Yamaoka Y, Graham DY, Perez-Trallero E, Wadstrom T, Suerbaum S, Achtman M. An African origin for the intimate association between humans and *Helicobacter pylori*. *Nature*, 2007, 445(7130): 915–918.
- [26] Cui YJ, Yu C, Yan YF, Li DF, Li YJ, Jombart T, Weinert LA, Wang ZY, Guo ZB, Xu LZ, Zhang YJ, Zheng HC, Qin N, Xiao X, Wu MS, Wang XY, Zhou DS, Qi ZZ, Du ZM, Wu HL, Yang XW, Cao HZ, Wang H, Wang J, Yao SS, Rakin A, Li YR, Falush D, Balloux F, Achtman M, Song YJ, Wang J, Yang RF. Historical variations in mutation rate in an epidemic pathogen, *Yersinia pestis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2013, 110(2): 577–582.
- [27] Diancourt L, Passet V, Chervaux C, Garault P, Smokvina T, Brisse S. Multilocus sequence typing of *Lactobacillus casei* reveals a clonal population structure with low levels of homologous recombination. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73(20): 6601–6611.
- [28] Song YQ, Sun ZH, Guo CY, Wu YR, Liu WJ, Yu J, Menghe B, Yang RF, Zhang HP. Genetic diversity and population structure of *Lactobacillus delbrueckii* subspecies *bulgaricus* isolated from naturally fermented dairy foods. *Scientific Reports*, 2016, 6: 22704.
- [29] Moss WW, Hendrickson Jr JA. Numerical taxonomy. *Annual Review of Entomology*, 1973, 18: 227–258.
- [30] Qi B, Han M. Microbial siderophore enterobactin promotes mitochondrial iron uptake and development of the host via interaction with ATP synthase. *Cell*, 2018, 175(2): 571–582.e11.
- [31] Sun ZH, Liu WJ, Song YQ, Xu HY, Yu J, Bilige M, Zhang HP, Chen YF. Population structure of *Lactobacillus helveticus* isolates from naturally fermented dairy products based on multilocus sequence typing. *Journal of Dairy Science*, 2015, 98(5): 2962–2972.
- [32] Yu J, Zhao J, Song YQ, Zhang JC, Yu ZJ, Zhang HP, Sun ZH. Comparative genomics of the herbivore gut symbiont *Lactobacillus reuteri* reveals genetic diversity and lifestyle adaptation. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 1151.
- [33] Schreiber O, Petersson J, Phillipson M, Perry M, Roos S, Holm L. *Lactobacillus reuteri* prevents colitis by reducing P-selectin-associated leukocyte- and platelet-endothelial cell interactions. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, 2009, 296(3): G534–G542.
- [34] Walter J. Ecological role of lactobacilli in the gastrointestinal tract: implications for fundamental and biomedical research. *Applied and Environmental Microbiology*, 2008, 74(16): 4985–4996.
- [35] Savage DC. Associations and physiological interactions of indigenous microorganisms and gastrointestinal epithelia. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 1972, 25(12): 1372–1379.

Genetic diversity of *Lactobacillus reuteri* isolated from intestines

Zhongjie Yu, Jie Zhao, Yuqin Song, Zhihong Sun*

Key Laboratory of Dairy Biotechnology and Engineering, Ministry of Education, Key Laboratory of Dairy Products Processing, Ministry of Agriculture, Inner Mongolia Key Laboratory of Dairy Biotechnology and Engineering, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018, Inner Mongolia Autonomous Region, China

Abstract: Thousands of bacteria are colonized in the intestinal tract of animals. *Lactobacillus reuteri* is a probiotic in animal gut and model strain for studying the evolutionary relationship between gut microbiota and host. **[Objective]** To study genetic diversity and host specificity of different isolates of *L. reuteri*, we analyzed 132 strains of *L. reuteri* including 116 strains isolated from human, poultry, rodents and pigs downloaded from NCBI database and 16 strains isolated from cow, sheep and horse in Inner Mongolia. **[Methods]** Seven housekeeping genes including *ddl*, *pkt*, *leuS*, *gyrB*, *dltA*, *rpoA*, and *recA* were used as targets in MLST (multilocus sequence typing) technology to study the genetic diversity of 132 *L. reuteri* and evolutionary relationship between strains and host habitats. **[Results]** All 132 strains of *L. reuteri* were assigned into 63 STs and 6 clonal complexes. Recombination analysis revealed that individual recombination events occurred during the evolution of *L. reuteri*. The eBURST and MSTree analysis showed that *L. reuteri* from different sources experienced distinct evolutionary processes. The 132 *L. reuteri* isolates were classified into 5 clusters by phylogenetic analysis, according to their correlation with the sources. **[Conclusion]** *L. reuteri* from different sources had high host specificity, indicating that *L. reuteri* may experience different evolutionary processes to adapt the distinct living environments.

Keywords: *Lactobacillus reuteri*, multilocus sequence typing technique, intestinal tract, host specificity

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31622043), by the Inner Mongolia Natural Science Foundation (2016JQ04) and by the Outstanding Youth Science Fund Project of Inner Mongolia Agricultural University (2017XJQ-2)

*Corresponding author. Tel/Fax: +86-471-4301591; E-mail: sunzhihong78@163.com

Received: 28 August 2018; Revised: 21 February 2019; Published online: 26 March 2019

孙志宏, 男, 国家优青, 研究员, 博士生导师。现就职于内蒙古农业大学乳品生物技术与工程教育部重点实验室, 从事乳酸菌生物多样性、基因组学和肠道微生物等方面的研究。主持承担了国家自然科学基金、“863 计划”研究任务、中科院西部之光、内蒙古科技计划重点项目和内蒙古杰青培养基金等诸多项目, 入选内蒙古自治区“草原英才”工程、内蒙古自治区“321 人才工程”。发表学术论文 98 篇, 其中作为第一作者或通信作者的 SCI 论文 36 篇, 最高影响因子 11.329 (*Nature Communications*), 授权发明专利 11 项, 参编学术专著 2 部, 参与起草 2 项质量安全地方标准。获内蒙古自治区科学技术进步一等奖、教育部科学技术进步二等奖、内蒙古自治区自然科学二等奖各 1 项, 荣获内蒙古优秀科技工作者称号、内蒙古自治区优秀博士学位论文。

