

肠道菌群中鼠李糖乳杆菌的菌落免疫印迹计数与分离

杨振泉^{1,2}, 贡湘磊¹, 叶平³, 谢鑫¹, 张宇¹, 高璐¹, 饶胜其¹, 尹永祺¹

(1. 扬州大学食品科学与工程学院, 江苏扬州 225127) (2. 江苏省乳品生物技术与安全控制重点实验室, 江苏扬州 225127) (3. 泰州市产品质量监督检验所, 江苏泰州 225309)

摘要: 本研究通过制备鼠李糖乳杆菌(*Lactobacillus rhamnosus*, Lr)菌毛蛋白 FimI 特异性抗体, 建立了 Lr 菌落免疫印迹计数与分离方法。将重组 FimI 蛋白(rFimI)免疫 BALB/c 小鼠获得抗血清, 用 Western 和全菌 Dot-Blot 鉴定抗血清的反应性和特异性, 建立基于 rFimI 抗血清的菌落免疫印迹方法, 并对模拟样品(小鼠肠道菌群+Lr)以及灌胃小鼠粪便中的 Lr 进行定量分析。结果显示获得的 rFimI 抗血清效价为 1:51200, 该血清和 Lr 裂解蛋白和菌体均呈强阳性反应, 与小鼠肠道菌群没有交叉反应。菌落免疫印迹中 rFimI 抗体最佳浓度为 1:2000, 所有含有 Lr 样品的菌落转印膜上都能呈现清晰的免疫印迹, 测定的阳性菌落数和模拟样品中预设的 Lr 浓度一致, 并能较好的反应灌服 Lr 的小鼠粪便中 Lr 的消长趋势。本研究建立的菌落免疫印迹方法为肠道样品中 Lr 的选择性计数和分离提供了快捷的方法。

关键词: 鼠李糖乳杆菌; 菌落免疫印迹; 计数; 分离

文章编号: 1673-9078(2016)07-60-65

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2016.7.010

Application of Colony Immunoblotting for Counting and Isolating

Lactobacillus rhamnosus in Intestinal Flora

YANG Zhen-quan^{1,2}, GONG Xiang-lei¹, YE Ping³, XIE Xin¹, ZHANG Yu¹, GAO Lu¹, RAO Sheng-qi¹, YIN Yong-qi¹

(1.College of Science and Engineering, Yangzhou University, Yangzhou 225127, China)

(2.Jiangsu Key Laboratory of Dairy Biotechnology and Safety Control, Yangzhou 225127, China)

(3.Product Quality Supervising and Inspecting Institute of Taizhou City, Taizhou 225309, China)

Abstract: A specific antibody against pilus protein (FimI) of *Lactobacillus rhamnosus* (Lr) was prepared, to develop a colony immunoblotting (CIB) counting and isolation method for Lr. BALB/c mice were immunized with recombinant FimI (rFimI) to obtain the antiserum, and the reactivity and specificity of the antiserum were tested by western blotting and whole bacterial dot-blot analysis. The CIB counting method was developed based on the rFimI antiserum, and was used to quantitatively detect Lr in the artificial sample (mouse intestinal flora + Lr) and the fecal samples from mice fed with Lr by gavage. The titer of the obtained antiserum was 1:51,200 and this antiserum showed strong reactivity with both the lysate and whole cells of Lr, but no cross-reactivity with the intestinal flora of mouse. The optimum dilution of rFimI antiserum for CIB was 1:2000, and clear immunoblots were observed on all colony transfer membranes of samples containing Lr. The positive colony number determined using the CIB method agreed with the Lr concentration in the artificial samples, which may reflect the fluctuation tendency of Lr in fecal samples from the mouse fed with Lr by gavage. The established CIB counting method can be used to selectively count and isolate Lr in intestinal samples.

Key words: *Lactobacillus rhamnosus*; colony immunoblotting; counting; isolation

鼠李糖乳杆菌 (*Lactobacillus rhamnosus*, Lr) 是近年来研究较多的益生菌之一, 国内外研究证实 Lr

收稿日期: 2015-08-28

基金项目: 国家自然科学基金项目(31371806); 江苏省高校自然科学基金项目(15KJA550004); 江苏省“青蓝工程”项目资助

作者简介: 杨振泉(1975-), 男, 博士, 副教授, 硕士生导师, 主要从事食品微生物资源开发与利用研究

在免疫调节、抑制肠道病原菌生长、维持肠道菌群平衡等方面具有重要作用^[1-2]。测定 Lr 体内定植及群体变化是研究该菌益生效应的基础, 然而由于肠道菌群复杂, 分析其中 Lr 数量变化不但成本高昂而且费时费力^[3]。建立快速灵敏的选择性计数与分离方法, 对于评价 Lr 益生菌产品质量、筛选理想 Lr 菌株、以及追踪复杂生态系统中的 Lr 均具有重要意义。目前常用的

Lr 选择性计数方法主要有实时荧光定量 PCR 检测法 (Real time-PCR)^[4-5]和选择性培养基分离法^[6-7]。Real time-PCR 方法快速、灵敏、特异性强,适合复杂样品中 Lr 的计数分析,但是操作技术要求高、所用的试剂和仪器设备昂贵;选择性培养法简便、快捷,易于操作和进一步菌株分离,但特异性和灵敏性不高^[8]。菌落免疫印迹技术 (Colony Immunoblotting, CIB) 是在斑点免疫杂交技术的基础上,结合常规或选择性平板分离对样品中的目标细菌进行选择性的计数的一种新型免疫检测技术^[9]。该法快速简便、特异性好,结果易于判断且不需要特殊的仪器,在复杂生态体系中的细菌检测与分离研究中显示了良好的应用前景^[10]。但是建立 CIB 需要获得针对细菌表面抗原的特异性抗体^[11],目前对 Lr 菌体表面特异性靶抗原研究尚不十分深入,CIB 技术在 Lr 检测和分离方面的应用国内外鲜见报道。

本研究通过重组 Lr 菌毛蛋白 (rFimI) 免疫小鼠获得特异性抗体,建立了 Lr 特异性 CIB 计数法,并应用该方法分析了模拟肠道菌群样品和灌胃小鼠粪便中 Lr 的变化规律,旨在为 Lr 选择性分离和计数提供快速灵敏的方法。

1 材料与方法

1.1 材料

乳酸菌菌株:鼠李糖乳杆菌、干酪乳杆菌,副干酪乳杆菌,肠膜明串珠菌,屎肠球菌,植物乳杆菌,戊糖片球菌,戊糖乳杆菌,香肠乳杆菌,发酵乳杆菌,乳酸乳球菌,融合乳杆菌,棒状乳杆菌,食品乳杆菌均由江苏省乳品生物技术与安全控制重点实验室分离并保藏;重组大肠杆菌 BL21-FimI 和纯化的 rFimI 蛋白由本实验室前期构建和制备;6 周龄 BALB/c 和 ICR 小鼠 购于扬州大学比较医学中心。MRS 培养基为广州环凯生物试剂有限公司产品;PCR 试剂、蛋白定量试剂盒、硝酸纤维素膜、HRP 标记的羊抗鼠 IgG、DAB 显色试剂,以及细菌 16S rDNA 扩增引物 8F: 5'-AGAGTTTGATCTGGCTCAG-3'和 15R: 5'-AAGGAGG TGATCCAGCCGCA-3'均购自上海生工生物工程有限公司;其它化学试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 乳酸菌培养

将菌株冻干菌粉接种 5 mL MRS 液体培养基,37 °C 厌氧培养 36 h,取培养物以 5% (V/V) 接种 MRS 液体培养基,37 °C 厌氧培养 24 h;4 °C 离心收集菌体

(8000 r/min, 10 min),用 PBS 缓冲液悬浮菌体,并调整 OD_{600nm}=1.0,所制得的菌悬液置 4 °C 保藏备用。

1.2.2 抗体制备

将纯化的 rFimI 蛋白加 0.01 mol/L PBS 溶解后,用 BCA 蛋白定量试剂盒进行浓度测定,操作按厂商试剂盒说明书进行。参考文献^[12]制备重组蛋白多克隆抗体。将健康 BALB/c 小鼠在新环境下预养一周后进行眼眶采血,分离血清作为阴性对照。以浓度为 0.1 mg/mL 的 rFimI 蛋白作为抗原,与等体积的弗氏完全佐剂混合乳化,初次免疫剂量为 0.05 mg/只,对实验小鼠进行腹部皮下注射;2 周后进行第 1 次加强免疫 (抗原量为初次免疫的 1/2),此后每隔 1 周加强免疫 1 次,共 3 次;最后一次免疫后 5 d 进行眼球采血,血液于 4 °C 放置 2 h,12000 r/min 离心 10 min,收集抗血清,-20 °C 保存备用。

1.2.3 抗血清效价测定

参考文献^[12]用包被液将 rFimI 稀释至 1.05 μg/mL,按每孔 100 μL 加入 96 孔酶标板,4 °C 包被过夜;倾去包被液,加 200 μL PBST 缓冲液洗涤 3 次,控干后加入 100 μL 5% 的脱脂乳,37 °C 封闭 1 h,PBST 洗涤 3 次;加倍比稀释的抗血清 37 °C 温育 1 h,洗涤 3 次;每孔加入 100 μL HRP 标记的羊抗兔 IgG (1:1000 稀释),37 °C 保温 1 h,洗涤 3 次;每孔加入 100 μL TMB 工作液,37 °C 避光反应 10 min,加入 50 μL 2 mol/L H₂SO₄ 终止反应,用酶标仪测定 450 nm 处吸光值,检测结果以 P (抗血清) / N (阴性血清) ≥ 2.1, P (抗血清) > 0.2 为阳性判断依据,抗血清效价用阳性反应的最高稀释度表示。

1.2.4 Western blot

将重组大肠杆菌 BL21-FimI,鼠李糖乳杆菌、干酪乳杆菌,副干酪乳杆菌以及植物乳杆菌细胞的超声波裂解物进行 SDS-PAGE 电泳分离,凝胶用去离子水洗涤 20 min,浸泡于转膜液中平衡 20 min,参考文献^[12]进行转印操作。将转印膜放入平皿,用 PBST 缓冲液洗涤 10 min,5% 脱脂乳孵育 1 h 后,再用 PBST 洗 3 次,每次 10 min;加入抗血清 (1:1000 稀释) 孵育 1 h,PBST 洗 3 次;加入 HRP 标记的羊抗兔 IgG (1:1000 稀释) 孵育 1 h,PBST 洗涤 3 次;与 DAB 显色液 37 °C 反应 10 min,拍片记录结果。

1.2.5 全菌 Dot-Blot

剪取适当大小的硝酸纤维素 (NC) 膜,于去离子水中浸泡 10 min,37 °C 干燥 10 min;取 10 μL 制备好的菌悬液点样于 NC 膜上,37 °C 干燥 30 min;加入 5% 的脱脂乳,室温封闭 1 h;取出后用 PBST 洗涤 3 次,分别与 PBST 稀释的抗血清 (1:250、1:500、1:1000、

1:2000) 进行反应, 室温孵育 1 h; 洗涤 3 次后加入 HRP 标记的羊抗鼠 IgG (1:1000 稀释), 孵育 1 h; 将 NC 膜洗涤 3 次, 浸入到新配制的 DAB 显色液中, 避光显色 10 min, 用去离子水漂洗 2 次终止反应, 自然干燥后拍片记录结果。

1.2.6 菌落免疫印迹 (Colony Immunoblotting)

将菌悬液用 PBS 缓冲液 10 倍梯度稀释, 涂布接种 MRS 平板, 37 °C 厌氧培养 36 h, 进行菌落计数, 并选择分离良好的平板用于菌落免疫印迹测定。剪取与培养皿内径大小相同的 NC 膜, 去离子水浸泡 10 min, 37 °C 干燥 10 min。将 NC 膜贴在平板表面, 使膜与培养基表面充分接触, 室温静置 5 min 后取下 NC 膜, 37 °C 干燥 30 min; 将转印膜放入 5% 的脱脂乳中, 室温封闭 1 h; PBST 缓冲液洗涤 3 次, 置于稀释度为 1:2000 的 rFimI 抗体稀释液中, 室温孵育 1 h; PBST 洗涤 3 次, 置于 HRP 标记的羊抗鼠 IgG (1:1000 稀释) 中孵育 1 h; 转印膜用 PBST 洗涤 3 次, 浸入新鲜配制的 DAB 显色液中, 避光显色 10 min, 用去离子水漂洗 2 次终止反应, 转印膜自然干燥后拍片记录结果, 并分析阳性斑点对应的菌落及数量。

1.2.7 阳性菌落确证

随机挑取阳性斑点对应的菌落, 接种 MRS 液体培养基, 按文献^[13]所述的 CTAB 方法提取基因组 DNA; 以基因组 DNA 为模板进行 16S rDNA 扩增。PCR 反应体系为: 2 μL 模板 (50 ng/μL)、4 μL dNTPs (25 mmol/L)、引物 8F (10 pmol/μL) 和 15R (10 pmol/μL) 各 1.5 μL、10×Buffer 5 μL、MgCl₂ (25 mmol/L) 5 μL、Tag 酶 (5 U/μL) 0.3 μL、加 ddH₂O 补足至 50 μL。PCR 扩增程序为: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 30 s, 50 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1.5 min, 35 次循环; 72 °C 延伸 10 min。PCR 产物委托上海生物工程有限公司测序, 所得序列在基因库 GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 中进行 Blastn 比对, 序列同源性大于 99% 设为相同种。

1.2.8 模拟样品中鼠李糖乳杆菌检测

解剖 6 周龄的健康 ICR 小鼠, 剪取盲肠, 纵向剖开, 刮取内容物, 用生理盐水 1:100 稀释, 800 r/min 离心 5 min, 收集上清作为小鼠肠道菌群悬液, 应用 MRS 平板稀释涂布法分别测定肠道菌群和 Lr 悬液样品中的细菌浓度。每 mL 肠道菌群悬液中分别加入 0、 1.6×10^2 cfu、 1.6×10^3 cfu、 1.6×10^4 cfu 的 Lr 细胞制成模拟样品 A、B、C、D, 取模拟样品涂布于 MRS 平板, 37 °C 厌氧培养 36 h 后, 应用菌落免疫印迹分析 Lr 阳性菌落数, 操作程序同 1.2.6。

1.2.9 小鼠粪便样品中鼠李糖乳杆菌检测

取 15 只 6 周龄的健康 ICR 小鼠, 随机分成 3 组, 按每只小鼠 1.5×10^{10} CFU 剂量灌服 Lr, 于第 0 d (灌服前)、1 d、2 d、3 d、4 d、5 d、10 d、15 d、20 d, 采集小鼠粪便, 同组小鼠粪便混合, 用生理盐水稀释后涂布 MRS 平板, 37 °C 厌氧培养 36 h 后, 计算菌落总数并应用菌落免疫印迹分析 Lr 阳性菌落数, 试验程序同 1.2.6, 取 3 组小鼠的平均值分析菌落总数和 Lr 的变化趋势。

1.2.10 数据统计分析

试验结果取 3 次试验的平均值, 样品间差异采用 Sigmaplot 10.0 软件中的 *t* 检验模式进行统计分析, 以 $p < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果与讨论

2.1 重组 FimI 蛋白的抗血清获得

以浓度为 0.1 mg/mL 的 rFimI 作为抗原免疫 BALB/c 小鼠, 加强免疫完成 5d 后对小鼠进行眼眶取血, 收集抗血清。用间接 ELISA 测定抗血清 (初始稀释度为 1/100) 对 rFimI 的效价, 结果显示抗血清稀释 2⁹ 倍时, 阳性血清 (P) 的 OD_{450nm} 值为 0.387, 阴性血清 (N) 的 OD_{450nm} 值为 0.134, P/N ≥ 2.1, 抗血清效价为 1:51200, 结果表明 rFimI 具有良好的免疫原性。

2.2 抗血清的 Western blot 鉴定结果

将重组大肠杆菌 BL21-FimI (对照 C), 鼠李糖乳杆菌, 干酪乳杆菌, 副干酪乳杆菌以及植物乳杆菌细胞的超声波裂解液进行 SDS-PAGE 电泳分离, 应用 Western blot 鉴定 rFimI 抗血清与菌体中天然 FimI 蛋白的反应性, 结果如图 1 所示。结果显示在 FimI 蛋白位置 (箭头位置), rFimI 抗血清与鼠李糖乳杆菌 (泳道 1) 出现阳性反应条带, 与干酪乳杆菌 (泳道 2) 和副干酪乳杆菌 (泳道 3) 反应微弱, 而与植物乳杆菌 (泳道 4) 未出现明显阳性反应, 结果表明 rFimI 抗体能够与鼠李糖乳杆菌中的天然 FimI 蛋白反应, 为鼠李糖乳杆菌的免疫检测提供了抗体工具。

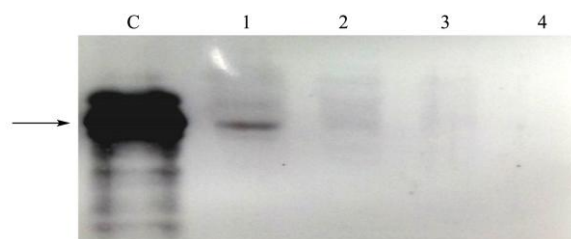


图 1 重组 FimI 抗血清的 Western blot 鉴定结果

Fig.1 Identification results of antiserum against recombinant FimI by western blot assay

注：图中，泳道 C 为重组大肠杆菌 BL21-FimI 裂解物作为阳性对照；泳道 1~4 分别为鼠李糖乳杆菌、干酪乳杆菌、副干酪乳杆菌、植物乳杆菌细胞的超声波裂物；箭头表示 FimI 蛋白位置。

2.3 抗血清的全菌 Dot-Blot 鉴定结果

为鉴定抗血清的特异性，将 14 种乳酸菌全细胞悬液 (OD_{600nm}=1.0) 点样于 NC 膜上，用 1:250、1:500、1:1000、1:2000 稀释的 rFimI 抗血清为检测抗体进行 Dot-Blot 分析，结果如图 2 所示。结果在测试的 14 个菌株中鼠李糖乳杆菌细胞能够与 rFimI 抗体呈强阳性反应 (图 2, 第 13 列)，干酪乳杆菌和副干酪乳杆菌与 FimI 抗体呈微弱反应 (图 2, 第 8、9 列)，但随着抗体稀释度增加信号迅速减弱，其它菌株细胞均没有出现反应信号。在 1:2000 稀释度 (D) 时，只有鼠李糖乳杆菌菌体呈清晰的斑点。结果表明 FimI 蛋白大量表达于鼠李糖乳杆菌的细胞表面，应用 rFimI 抗体 (选择 1:2000 作为最佳工作浓度) 能够特异性检测鼠李糖乳杆菌细胞。研究结果也为进一步应用 rFimI 抗体对复杂微生态体系中鼠李糖乳杆菌的免疫磁珠捕获提供了依据。

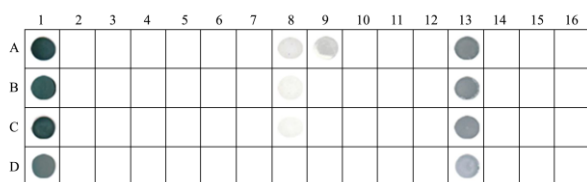


图 2 全菌免疫印迹检测乳酸菌菌体与 rFimI 抗体的反应性

Fig.2 Reactivity between lactic acid bacterial cells and rFimI antibody detected by Dot-Blot assay

注：图中，A、B、C、D 行表示抗血清稀释度依次为 1:250、1:500、1:1000、1:2000；1：为 rFimI 蛋白 (阳性对照)；2：类布氏乳杆菌菌体；3：戊糖片球菌菌体；4：植物乳杆菌；5：食品乳杆菌；6：戊糖乳杆菌；7：肠膜明串珠菌；8：干酪乳杆菌；9：副干酪乳杆菌；10：棒状乳杆菌；11：发酵乳杆菌；12：香肠乳杆菌；13：鼠李糖乳杆菌；14：融合乳杆菌；15：乳酸乳球菌；16：BSA (阴性对照)。

2.4 rFimI 抗体与鼠李糖乳杆菌菌落的反应性

将乳酸菌划线接种 MRS 平板，厌氧培养 36 h 形成的菌落，应用 1:2000 稀释的 rFimI 抗体进行菌落免疫印迹分析，结果显示鼠李糖乳杆菌形成的所有菌落均能形成清晰的印迹 (图 3, A1)，而其它乳酸菌 (副干酪乳杆菌、发酵乳杆菌、干酪乳杆菌和植物乳杆菌) 划线的平板均未形成菌落印迹 (图 3, B1、C1、D1、E1)，结果表明鼠李糖乳杆菌的 FimI 蛋白在 MRS 平

板培养过程中能够在菌体表面大量表达，所建立的菌落免疫印迹条件适合鼠李糖乳杆菌的菌落检测。

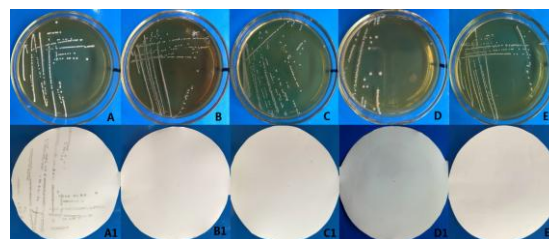


图 3 鼠李糖乳杆菌纯培养物的菌落免疫印迹

Fig.3 Detection of pure culture of *L. rhamnosus* by colony immunoblotting assay

注：图 A~E 分别为鼠李糖乳杆菌、副干酪乳杆菌、发酵乳杆菌、干酪乳杆菌、植物乳杆菌的纯培养物在 MRS 平板上划线形成的菌落形态；图 A1~E1 分别为上述菌株在 NC 转印膜上形成的免疫印迹。

2.5 小鼠肠道模拟样品中鼠李糖乳杆菌菌落

免疫印迹计数

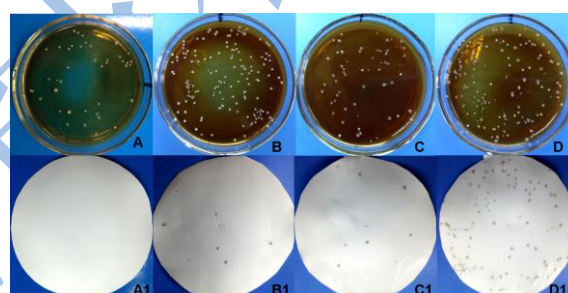


图 4 肠道模拟样品中鼠李糖乳杆菌的免疫印迹检测结果

Fig.4 Colony immunoblotting results for detecting *L. rhamnosus* in the artificial intestinal samples

注：图 A、B、C、D 为样品涂布 MRS 平板生长 36h 后的菌落形态；图 A1、B1、C1、D1 表示 MRS 平板上菌落在 NC 转印膜上形成的免疫印迹。

将小鼠肠道菌群悬液与鼠李糖乳杆菌纯培养物按不同比例的混合形成的模拟样品 (A、B、C、D)，按照常规 MRS 平板计数方法进行培养，并进行菌落免疫印迹分析，结果如图 4 和表 1 所示。结果显示模拟样品 A (未添加 Lr) 中阳性菌落为 0 (图 4, A1)，表明小鼠肠道菌群中不存在与 rFimI 抗体交叉反应的菌株；加入鼠李糖乳杆菌的样品 (B、C、D)，在转印膜上出现清晰可辨的菌落印迹 (图 4, B1、C1、D1)，免疫印迹阳性菌落数和预设鼠李糖乳杆菌浓度在数量级上一致 (表 1)。随机挑取了 27 个免疫印迹阳性和 9 个免疫印迹阴性菌落进行 16S rDNA 测序，序列聚类 and 比对结果如图 5 所示，结果表明 27 个免疫印迹阳性菌落 (colony 1-27) 聚成一簇，均鉴定为鼠李糖乳杆

菌(同源性 $\geq 99\%$),而9个免疫印迹阴性菌落(colony 28~36)的序列显示了较高的多样性,鉴定为:*Enterococcus faecium*、*Enterococcus durans*、*Lactobacillus coryniformis*、*Lactobacillus plantarum*、*Pediococcus pentosaceus*、*Lactobacillus johnsonii*。这

些结果表明常规的MRS平板计数结合*rFimI*抗体免疫印迹技术不仅可以用于小鼠肠道样品中特定鼠李糖乳杆菌的快速计数,而且可以根据免疫印迹对应的菌落位置挑取菌落实现快速分离。

表1 肠道模拟样品中鼠李糖乳杆菌的菌落免疫印迹计数结果

Table 1 Colony immunoblotting counting of *L. rhamnosus* in the artificial intestinal samples

样品	小鼠肠道菌群 ^a (/Log CFU/mL)	鼠李糖乳杆菌 ^a (/Log CFU/mL)	菌落免疫印迹计数结果 ^b (/Log CFU/mL)	
			MRS 平板菌落数	免疫印迹阳性菌落数
A	4.78	0	4.67	0
B	4.78	2.20	4.87	2.54
C	4.78	3.20	4.83	3.04
D	4.78	4.20	4.88	4.58

注: ^a 纯培养物计数并稀释后计算浓度值; ^b 样品混合以后实际测定的浓度; 数据为三次试验的平均值。

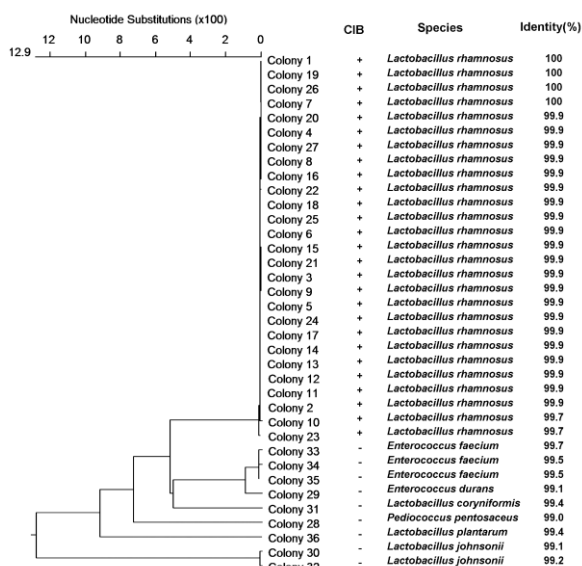


图5 MRS 平板菌落的 16S rDNA 测序鉴定结果

Fig.5 16S rDNA sequencing identification results of the colonies from MRS agar plates

注: 图中 Colony 1-36 代表从 MRS 平板上随机挑取的菌落 16S rDNA 扩增产物的序列, CIB+表示在 NC 转印膜上形成的免疫印迹的菌落; CIB-表示未形成的免疫印迹的菌落; Species 和 Identity 分别表示测序结果与 GenBank 中同源性最高序列的种属和相似度。

2.6 鼠李糖乳杆菌灌胃小鼠粪便的菌落免疫印迹分析

将鼠李糖乳杆菌灌胃 ICR 鼠, 分别于第 0 d (灌胃前) 和灌胃后的第 1 d、2 d、3 d、4 d、5 d、10 d、15 d 和 20 d 采集小鼠粪便, 采用常规的 MRS 平板计数结合 *rFimI* 抗体免疫印迹计数法测定乳酸菌总数 (TC) 和 Lr 含量, 检测结果如图 6 所示。结果显示

灌胃前小鼠的粪便中 MRS 菌落总数为 7.88 Log CFU/g, 免疫印迹阳性菌落数未检出, 灌胃 Lr (剂量为每只 1.5×10^{10} CFU) 后, 免疫印迹阳性菌落数水平在 1 d、2 d、3 d 的粪便中最高(含量在 7.56 至 7.74 Log CFU/g 之间), 第 4-10 d 缓慢下降到 6.31 Log CFU/g, 第 15 d 后免疫印迹阳性菌落均未检出; 小鼠灌胃 Lr 同时导致粪便中 MRS 菌落总数在前 5 d 呈缓慢上升趋势, 从 8.43 Log CFU/g 上升到 9.24 Log CFU/g, 随后逐渐下降, 到第 15 d MRS 菌落总数和灌胃前没有显著差别。Szymanski 等研究表明鼠李糖乳杆菌的一些菌株具有较高的体内定植能力, 服用 14 d 后粪便中仍然能够检测到活菌^[14], 本研究中以鼠李糖乳杆菌 (grx19, CGMCC No.5519) 为测试菌株, 虽然第 15 d 未能检出活菌, 但是在第 10 d 仍然能检测到一定水平的活菌数, 表明该菌株同样具有良好的体内定植能力。

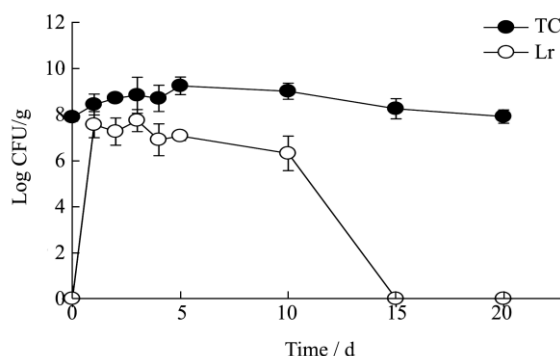


图6 灌胃小鼠粪便样品中鼠李糖乳杆菌的菌落免疫印迹分析结果

Fig.6 Colony immunoblotting analysis of *L. rhamnosus* in fecal samples from the mouse fed with Lr by gavage

图中, TC 表示 MRS 平板上的菌落总数, Lr 表示免疫印迹阳性菌落数。

3 结论

菌毛或纤毛 (Pili 或 Fimbriae) 是革兰氏阴性和革兰氏阳性细菌表面的蛋白质类附属物, FimI 蛋白是鼠李糖乳杆菌菌毛的主要结构蛋白, 可以作为鼠李糖乳杆菌免疫检测及分离的潜在靶抗原。本研究应用 *rFimI* 蛋白免疫小鼠获得了 FimI 特异性多克隆抗体, 并应用 *rFimI* 抗体建立了特异性鼠李糖乳杆菌菌落免疫印迹法, 结合常规 MRS 平板分离技术实现了模拟样品和灌胃小鼠粪便样品中 Lr 的选择性计数和分离。在实验条件下, 所有含有 Lr 样品的转印膜上均能呈现清晰的免疫印迹, 与小鼠肠道菌群其它菌株没有交叉反应; 定量结果显示免疫印迹阳性菌落水平与混合样品中预设的 Lr 浓度的在数量级上一致, 对灌胃小鼠粪便中 Lr 的分析结果表明该方法可以用于快速分析小鼠肠道样品中 Lr 的动态变化。与现有的选择性培养基计数方法相比, 该方法特异性和灵敏性更高; 与荧光定量 PCR 方法相比, 该法操作简单, 不需要昂贵的仪器, 更适合生产和基层单位, 以及大量样品的分析。本研究为鼠李糖乳杆菌优良菌株筛选、益生菌产品质量检测及探索其在肠道内的动态变化规律提供了更为便捷、廉价的工具。

参考文献

- [1] Marijke E Segers, Sarah Lebeer. Towards a better understanding of *Lactobacillus rhamnosus* GG-host interactions [J]. *Microbial Cell Factories*, 2014, 13: 1-16
- [2] 王海波, 马微, 钱程, 等. 益生菌的研究现状及发展趋势 [J]. *现代食品科技*, 2006, 22(3): 286-288
WANG Hai-bo, MA Wei, QIAN Cheng, et al. The current research and development trend of probiotic [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2006, 22(3): 286-288
- [3] Zhong Y, Nyman M. Prebiotic and synbiotic effects on rats fed malted barley with selected bacteria strains [J]. *Food and Nutrition Research*, 2014, 58: 24848
- [4] Haarman M, Knol J. Quantitative real-time PCR analysis of fecal *Lactobacillus* species in infants receiving a prebiotic infant formula [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72: 2359-2365
- [5] 包秋华, 张家超, 李梅花, 等. 一种快速定性和定量检测发酵乳中 *L. rhamnosus* 的方法 [J]. *乳业科学与技术*, 2010, 5: 225-227
- [6] BAO Qiu-hua, ZHANG Jia-chao, LI Mei-hua, et al. A rapid qualitative and quantitative detection method of *L. rhamnosus* in the fermented milk [J]. *Dairy Science and Technology*, 2010, 5: 225-227
- [6] Lena MD, Quero GM, Santovito E, et al. A selective medium for isolation and accurate enumeration of *Lactobacillus casei*-group lactobacilli in probiotic milks and dairy products [J]. *International Dairy Journal*, 2015, 47: 27-36
- [7] Davis C. Enumeration of probiotic strains: review of culture-dependent and alternative techniques to quantify viable bacteria [J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2014, 103: 9-17
- [8] Sakai T, Oishi K, Asahara T, et al. M-RTL agar, a novel selective medium to distinguish *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus paracasei* from *Lactobacillus rhamnosus* [J]. *International Journal of Food Microbiol*, 2010, 139: 154-160
- [9] Duez H, Pelletier C, Cools S, Aissi E, et al. A colony immunoblotting method for quantitative detection of a *Bifidobacterium animalis* probiotic strain in human faeces [J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2000, 88: 1019-1027
- [10] Wieckowska-Szakiel M, Bubert A, Rozalski M, et al. Colony-blot assay with anti-p60 antibodies as a method for quick identification of *Listeria* in food [J]. *International Journal of Food Microbiol*, 2002, 72: 63-71
- [11] Brovko L, Young D, Griffiths MW. Method for assessment of functional affinity of antibodies for live bacteria [J]. *Journal Microbiol Methods*, 2004, 58: 49-57
- [12] 沈关心, 周汝麟. 现代免疫学实验技术 (第2版) [M]. 武汉: 湖北科学技术出版社, 2002
SHEN Guan-xin, ZHOU Ru-lin. *Modern immunology experiment technology (version 2)* [M]. Wuhan: Hubei publishers of science and technology, 2002
- [13] 奥斯博. 精编分子生物学实验指南 [M]. 颜子颖, 等译. 第3版. 北京: 科学出版社, 2008: 22-23
Ausubel. *Short Protocols in Molecular Biology (version 3)* [M]. Beijing: science press, 2008: 22-23
- [14] Szymanski, H, Chmielarczyk A, Strus M, et al. Colonisation of the gastrointestinal tract by probiotic *L. rhamnosus* strains in acute diarrhoea in children [J]. *Digestive and Liver Disease*, 2006, 38: S274-S276