

冷却肉中假单胞菌 16S rRNA 基因不同 可变区片段 DGGE 研究

江 芸^{1,2}, 高 峰², 苏 勇³, 徐幸莲², 周光宏²

(1. 南京师范大学金陵女子学院食品科学与营养系, 江苏 南京 210097; 2. 南京农业大学 国家肉品质量安全控制工程技术研究中心, 江苏 南京 210095; 3. 南京农业大学动物科技学院, 江苏 南京 210095)

摘 要: 为揭示变性梯度凝胶电泳(DGGE)技术存在的一些技术缺陷, 本实验以冷却肉中不同假单胞菌相关克隆为例, 分别在 V3 和 V6~V8 两个不同可变区片段比较不同假单胞菌的 16S rRNA 基因差异。结果表明, 以不同可变区为扩增目标进行研究, 假单胞菌的 DGGE 图谱结果存在差异; 基因片段序列的 G+C 含量与图谱中迁移位置并非绝对相关。DGGE 技术的这一缺陷很大程度上是由细菌 16S rRNA 基因序列的自身特性所引起的。

关键词: 16S rRNA 基因; 变性梯度凝胶电泳; 假单胞菌

DGGE Analysis of Different Variable Region Fragments in 16S rRNA Gene of *Pseudomonas* from Chilled Meat

JIANG Yun^{1,2}, GAO Feng², SU Yong³, XU Xing-lian², ZHOU Guang-hong²

(1. Department of Food Science and Nutrition, Ginling College, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China;
2. National Center of Meat Quality and Safety Control, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China;
3. College of Animal Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: In this study, 16S rRNA gene sequences of different *Pseudomonas* cloned from chilled meat were analyzed based on V3 and V6-V8 region fragments to explore the technical defects of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). The results showed that different variable regions of 16S rRNA could lead to different DGGE results, and the (G + C) contents of variable region fragments were not related to the migrating distance in the DGGE. Therefore, the limitation of DGGE was due to the innate characteristics of bacterial 16S rRNA gene sequences to some extent.

Key words: 16S rRNA gene; denaturing gradient gel electrophoresis; *Pseudomonas*

中图分类号: TS251.51

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2011)17-0287-05

近年来, 随着分子生物学的发展, 基于 DNA 指纹技术的分子生物学研究手段越来越多地被引入到微生物学包括食品微生物学研究中, 例如变性梯度凝胶电泳法(DGGE)、限制性片段长度多态性分析(restriction fragment length polymorphism, RFLP)、末端限制性片段长度多态性分析(terminal restriction fragment length polymorphism, TRFLP)、随机扩增多态性 DNA(random amplified polymorphic DNA, RAPD)、单链构象多态性分析(single strand conformational polymorphism, SSCP)等。其中 DGGE 具有可靠性强、重现性高、方便快捷等优点而越来越受到重视, 是近年来微生物学研究中应用较广泛的分子技术之一。

DGGE 技术是由 Fischer 和 Lerman 于 1979 年最先提出的用于检测 DNA 突变的一种电泳技术^[1]。1993 年 Muzyer 等^[2]首次将 DGGE 技术应用于微生物生态学研究, 并证实了这种技术在研究自然界微生物群落的遗传多样性和种群差异方面具有明显的优越性。与传统微生物学方法相比, DGGE 可不采用培养方法, 而从食物样品中直接提取总 DNA, 这样能检测到难以培养或不能培养的微生物, 能够同时检测多种微生物, 而且检测速度快。目前 DGGE 技术在食品微生物研究方面有许多报道, 如奶酪、香肠、酸面团、泡菜、葡萄酒、牛肉等食品均有报道^[3-7]。本课题组近期运用 PCR-DGGE 对托盘包装冷却猪肉冷藏过程中的菌相变化进行了研究^[8]。

收稿日期: 2011-01-18

基金项目: 国家自然科学基金项目(31071614); 江苏省高校自然科学基金项目(08KJB550005)

作者简介: 江芸(1971—), 女, 副教授, 博士, 研究方向为肉品安全与质量控制。E-mail: Jiangyun@njnu.edu.cn

生物进化过程中,核糖体RNA分子保持相对恒定的生物学功能和保守的碱基排列顺序,同时也存在着与进化过程相一致的突变率,在结构上可分为保守区和可变区。不同细菌,其16S rDNA可变区的碱基组成不同,据此,DGGE技术可设计引物针对细菌16S rDNA的可变区扩增出长度相等而序列不同的片段,根据扩增产物的不同融解特性在变性梯度凝胶上将不同碱基组成的核酸片段分开^[9]。Myers等^[10]通过模拟实验表明,利用该技术区分一个碱基差异的核酸概率为95%。但是,近年有研究者发现DGGE技术常常不能分离不同组成的16S rDNA片段,DGGE图谱上的单一条带有时被鉴定为不同种的细菌^[11-13];另一方面,不同的条带也可能被鉴定为相同种的细菌^[3,14]。本课题组在运用PCR-DGGE研究托盘包装冷却猪肉冷藏过程中的菌相变化时,亦发现假单胞菌以不同可变区为扩增目标进行研究,其结果存在差异^[8]。

本实验在前期托盘包装冷却猪肉冷藏过程中菌相变化研究的基础上^[8],以不同假单胞菌相关克隆为例,分别在V3和V6~V8两个不同可变区片段比较不同假单胞菌的16S rRNA基因差异,旨在揭示DGGE技术存在的一些技术缺陷。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

1.1.1 样品采集及处理

由本市某冷却猪肉专卖店购买3条猪后腰肉(A组、B组、C组),由专卖店工作人员按正常操作程序分别切分成5块,用洁净包装袋按组分别包装,置于冰盒中于30min内送至实验室,立即将每块肉样各放入一洁净托盘,保鲜膜包裹,分别标上A组、B组、C组。4℃冰箱放置,分别于第0、3、6、9、12天每组各取1个包装,取肉样进行以下分析。

1.1.2 试剂

AxyPrep细菌基因组DNA小量试剂盒 美国Axygen公司; Wizard SV Gel and PCR Clean-up System 纯化试剂盒、GoTaq Green Master Mix (2×)、pGEM-T载体、感受态细胞*E. coli* JM109 美国Promega公司; 丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、尿素、Tris、EDTA、甲酰胺(分析纯)、四甲基乙二胺(Tetramethylethylenediamine, TEMED)、甘油、过硫酸胺、琼脂糖 美国Sunshine公司; DNA Marker DL2000 宝生物工程(大连)有限公司; Goldview 染料 北京赛百盛公司; 溴化乙锭(Ethidium bromide, EB)应用液 美国Sigma公司; LB筛选培养基 北京陆桥有限公司; 本实验所用引物均由上海英俊生物技术有限公司合成。

1.1.3 仪器与设备

DGGE电泳仪 BioRad DCode apparatus、凝胶成像仪 GelDoc 2000 system 美国Bio-Rad公司; Mastercycler ep personal PCR仪 德国Eppendorf公司; 水平电泳仪 北京百晶生物技术有限公司; DHZ-C恒温振荡器 江苏太仓市实验设备厂; 64R台式高速冷冻离心机 美国Beckman公司; Anke TLG-16G台式离心机 上海安亭科学仪器厂; LX-100手掌型离心机 江苏海门市其林贝尔公司; SW-CF-IF超净工作台 苏州安泰充气技术有限公司。

1.2 直接提取冷却肉细菌DNA、PCR-DGGE分析

参照Jiang等^[8]描述的方法直接提取冷却肉细菌DNA。采用巢氏PCR扩增冷却肉细菌16S rRNA基因V3可变区和V6~V8可变区,其中V3区第一轮PCR引物为8f/798r,第二轮PCR引物为GC338f/518r, V6~V8区第一轮PCR引物为8f/1492r,第二轮PCR引物为GC968f/1401r^[2,15-18]。

参照Muyzer等^[2]方法,对细菌16S rRNA基因的V3区和V6~V8区扩增产物分别进行DGGE分析。采用DGGE电泳仪,8%聚丙烯酰胺凝胶(丙烯酰胺与甲叉双丙烯酰胺的质量比为37.5:1),变性梯度V3区为35%~55%、V6~V8区为38%~50%(100%变性剂含有7mol/L尿素和40%甲酰胺),在0.5×Tris-acetate-ethylenediaminetetraacetic acid(TAE)缓冲液中,60℃恒温条件下,先200V电压预电泳10min,随后再85V电压电泳16h。电泳结束后,将DGGE胶片用1×TAE缓冲液(含0.5mg/L EB)染色15min。弃去染色液,再用ddH₂O漂洗20min。染色后用凝胶成像系统照相。

1.3 16S rRNA基因全序列的克隆和分析

为了鉴定肉样DGGE图谱中的主要条带,随机选取C组第0天和第12天冷却肉细菌DNA进行16S rRNA基因全序列的克隆和分析。

一对细菌通用引物clone-8f(5'-CAC GGA TCC AGA GTT TGA TC/TA/CTGG CTC AG-3')和1510r(5'-GTG AAG CTT ACG GC/TT ACC TTG TTA CGA CTT-3')用于扩增细菌16S rRNA基因全序列^[16]。PCR反应体系(50μL): GoTaq Green Master Mix (2×) 25μL、引物各1μL (0.2μmol/L)、DNA模板1μL、ddH₂O 22μL。PCR扩增程序: 95℃预变性3min; 95℃变性30s, 53℃退火30s, 72℃延伸1min, 30个循环; 最后72℃再延伸7min^[16-17]。

PCR产物经纯化试剂盒纯化后,插入pGEM-T载体并转化入*E. coli* JM109。以T7和SP6为引物进行PCR反应以检测插入子的大小。插入子正确的克隆(约1.6kb)以含GC夹板的引物分别扩增其16S rRNA基因序列的V3可变区和V6~V8可变区,与原样品在DGGE胶上进行比较,寻找匹配的条带。将与原样品有匹配条带的克

隆进行测序。登录 NCBI(www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/), 将所得序列与数据库中的已知序列进行相似性比对^[19]。

利用 OMIGA 2.0 软件分别获得引物 338f/518r 和 968f/1401r 扩增的上述一些克隆 16S rRNA 基因 V3 区和 V6~V8 区片段序列, 进一步用该软件计算出 16S rRNA 基因全序列、V3 和 V6~V8 区片段序列的 G+C 含量。

1.4 核苷酸序列的基因库登录号

6 个冷却肉中细菌 16S rRNA 基因克隆序列已被 GenBank 收录, 序列收录号为 GQ422759~GQ422761、GQ422763、GQ422764、GQ422767。

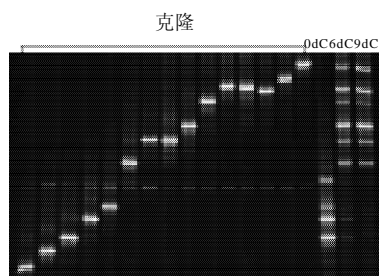
2 结果与分析

2.1 16S rRNA 基因全序列的克隆和分析

将 3 组冷却猪肉第 0~12 天提取的细菌 DNA 扩增的 16S V3 区和 V6~V8 区的产物分别进行 DGGE 分析, 结果已另文发表^[8], 为了鉴定 DGGE 图谱中的主要条带, 随机选取 C 组第 0 天和第 12 天冷却肉细菌 DNA 进行 16S rRNA 基因全序列克隆, 采用引物 T7/SP6 进行 PCR, 鉴定得到插入子正确的阳性克隆(约 1.6 kb)共 102 个, 其中第 0 天为 43 个, 第 12 天为 59 个。

将克隆子以含 GC 夹板的引物分别扩增其 16S rRNA 基因序列的 V3 区和 V6~V8 区, 与原样品在 DGGE 胶上进行比较, 寻找匹配的条带。部分克隆筛选的 DGGE 图谱见图 1。经过多次比较, 找到了与样品主要条带相匹配的克隆, 将与原样品主要条带有匹配的克隆进行测序, 登录 NCBI 用 Blast 在 GenBank 数据库中与参考序列进行相似性分析, 结果已另文发表^[8]。

筛选克隆测序过程中, 通过与 GenBank 数据库的序列进行同源性比较, 得到一些 16S rRNA 基因与假单胞菌相关, 进一步对其中 6 个假单胞菌克隆(表 1)进行 V3 区和 V6~V8 区 DGGE 分析。



泳道 0dC、6dC、9dC。分别表示托盘包装猪肉 C 组第 0、6、9 天的样品。

图 1 部分克隆筛选 16S rRNA 基因 V3 区 DGGE 图谱

Fig.1 DGGE profiles of PCR products of the V3 region of 16S rRNA genes from some clones

表 1 一些假单胞菌 16S rRNA 基因克隆

Table 1 16S rRNA gene cloning of different *Pseudomonas* strains

克隆	最相似已知菌	片段长度 /bp	相似性 /%	登录号
A1	<i>Pseudomonas</i> sp.	1500	99.7	GQ422763
A3	<i>Pseudomonas</i> sp.	1500	100	GQ422759
A4	<i>Pseudomonas</i> sp.	1500	99.9	GQ422760
A8	<i>Pseudomonas</i> sp.	1500	99.7	GQ422761
A16	<i>Pseudomonas</i> sp.	1500	99.5	GQ422764
B25	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	1505	99.8	GQ422767

2.2 假单胞菌克隆 16S rRNA 基因两种可变区片段的 DGGE 比较

6 个假单胞菌克隆 16S rRNA 基因 V3 和 V6~V8 可变区的 DGGE 图谱如图 2 所示。由图 2 可知, V3 可变区的图谱中(图 2A), 各克隆均迁移至不同的位置, 而 V6~V8 可变区的图谱中(图 2B), 克隆 A1、A4 和 A8 具有相同的迁移距离。结果表明以不同可变区为扩增目标进行研究, 其结果存在差异。

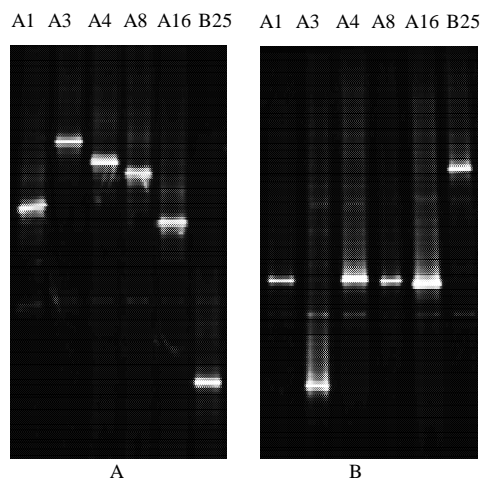


图 2 6 个假单胞菌 16S rRNA 基因单克隆 V3 区(A)和 V6—V8 区(B)扩增产物的 DGGE 图谱

Fig.2 DGGE profiles of PCR products of the V3 (A) and V6—V8 (B) regions of 16S rRNA gene sequences from *Pseudomonas*

2.3 假单胞菌克隆 16S rRNA 基因两种可变区片段序列的 G+C 含量

利用 OMIGA 2.0 软件, 分别获得引物 338f / 518r 和 968f / 1401r 扩增的上述 6 个假单胞菌 16S rRNA 基因 V3 区和 V6~V8 区片段序列, 进一步用该软件计算出 16S rRNA 基因全序列、V3 和 V6~V8 区片段序列的 G+C 含量, 结果如表 2 所示。

表2 假单胞菌 16S rRNA 基因不同可变区序列的 G+C 含量
Table 2 (G + C) contents of different variable region fragments of 16S rRNA gene sequences obtained from *Pseudomonas*

克隆	G+C 含量 /%		
	16S rRNA 全序列	V3 可变区	V6~V8 可变区
A1	53.0	51.8	53.6
A3	53.0	50.8	54.0
A4	52.7	51.3	53.3
A8	53.0	51.3	54.0
A16	53.0	52.3	53.8
B25	54.2	54.8	52.3

由表2及图2可知, V3 可变区, 克隆 A3、A4/A8、A1、A16 和 B25 随着 G+C 含量增多, 在 DGGE 图谱中迁移至变性梯度更高的位置; 而 V3 区克隆 A4 和 A8、V6~V8 区克隆 A3 和 A8, 虽然具有相同的 G+C 含量, 但它们在 DGGE 胶上迁移至不同的位置; V6~V8 可变区, 克隆 A1、A4 和 A8 的 G+C 含量各不相同, 却在 DGGE 胶上迁移至相同位置。结果表明基因片段序列的 G+C 含量与图谱中迁移位置并非绝对相关。

3 讨 论

应用 DGGE 技术研究食品中的细菌多样性或动态变化时可以选择 16S rRNA 基因的不同可变区, 如 V1 区、V1~V3 区、V3 区、V3~V4 区、V4~V5 区、V6 区、V6~V8 区、V9 区等均有报道^[20]。V3 区在乳制品、发酵香肠、酸面团、水、酒等可见报道, V6~V8 区在乳制品、发酵香肠、生鲜牛肉等可见报道^[3-7]。近期, 本课题组选择 V3 和 V6~V8 两个可变区对托盘包装冷却猪肉冷藏过程中的菌相变化进行了 DGGE 比较研究, 实验结果表明, 假单胞菌是冷却肉中的常见污染菌, 也是贮藏末期主要优势腐败菌^[8]。

本实验, 是在前期研究基础上, 选择一些来自肉样中的假单胞菌克隆, 对其 16S rRNA 基因 V3 和 V6~V8 可变区同时进行了 DGGE 分析, 结果发现不同可变区实验结果存在差异, 如克隆 A1、A4 和 A8 的 V6~V8 区扩增片段在 DGGE 胶上迁移至相同位置, 而它们 V3 区扩增片段在 DGGE 胶上则位于不同位置, 表明同一样品, 当研究的可变区不同时可能获得不一样的实验结果。引物 338f/518r 和 968f/1401r 是最常用的两对细菌通用引物, 它们所扩增的 16S rRNA 基因片段分别为 V3 和 V6~V8 可变区。Watanabe 等^[21]发现某些通用引物在 PCR 扩增时存在错配现象, 从而导致不同引物扩增的 PCR 产物序列组成发生偏差, 进一步影响 DGGE 结果。Sekiguchi 等^[12]发现, 不同种的细菌在 DGGE 图谱上具有相同泳动位置, 或 DGGE 图谱上的单一条带可能被鉴定为不同种的细菌, 并认为与 PCR 扩增及序列测定过程中

的错配有关。Guan 等^[22]、苏勇^[23]研究发现, 一些不同种的细菌具有相同的 16S rRNA 基因部分序列。本实验中, 一些假单胞菌的 V6~V8 区扩增片段在 DGGE 胶上迁移至相同位置, 可能是由于它们 V6~V8 区扩增片段基因序列组成相近^[22-23]; 也可能是由于它们扩增片段基因序列组成虽不同, 但融解特性相似^[24]; 亦有可能是由于所使用的通用引物导致 PCR 扩增时错配, PCR 产物序列组成发生偏差^[21]。本实验还发现, 基因片段序列的 G+C 含量与图谱中迁移位置并非绝对相关, DGGE 技术是根据 PCR 产物的不同融解性而将不同碱基组成的核酸区分开^[9], 有研究表明, 核酸片段的融解特性主要是由基因片段中 G-C 和 A-T 含量及序列的组成决定的^[24]。

另外, 需要说明的是, 本实验 DGGE 结果显示一些位于不同泳动位置的 DGGE 条带均被鉴定为假单胞菌属, 这可能是 16S rRNA 基因中 V3 和 V6~V8 可变区片段无法区分假单胞菌属所包含的种。实际上, 已有一些研究亦报道 16S rRNA 基因不足以区分假单胞菌至种的水平, 因而可试图通过分析其他目标基因, 如 *carA* 基因、*recA* 基因、*gyrB* 基因、*fliC* 基因和 *rpoD* 基因来进行假单胞菌不同种的鉴定^[25-27]。

综上所述, 16S rRNA 基因部分序列并不能完全代替 16S rRNA 基因全序列, 但是 DGGE 技术又要求分析的核酸片段不能超过 500bp, 这也是 DGGE 技术最主要的局限性所在。尽管存在一些缺陷, DGGE 技术仍是当前用于菌群结构分析的最广泛、最有效的手段之一。本实验提示, 应用 DGGE 研究某种食品中的细菌组成时选择 16S rRNA 基因的可变区应慎重, 在进行引物设计时, 除了考虑引物序列的特异性外, 还应对所扩增的不同细菌的核酸序列进行分析, 以确定其是否适合 DGGE 分析。目前, 也有一些研究者试图通过应用其他基因序列来研究菌群, 如 23S rRNA 基因及 16S~23S 间区序列等^[28-29], 但这些方法还有待进一步验证, 其序列数据库也有待进一步丰富和完善。

参考文献:

- [1] FISHCER S G, LERMAN L S. Length-independent separation of DNA restriction fragments in two dimensional gel electrophoresis[J]. Cell, 1979, 16: 191-200.
- [2] MUYZER G, WAAL E C, UITTERLINDEN A G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA [J]. Applied Environmental Microbiology, 1993, 59: 695-700.
- [3] COCOLIN L, MANZANO M, CANTION C, et al. Denaturing gradient gel electrophoresis analysis of the 16S rRNA gene V1 region to monitor dynamic changes in the bacterial population during fermentation of Italian sausages[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2001, 67: 5113-5121.
- [4] KUANG Y, TANI K, SYNNOTT A J, et al. Characterization of bacterial population of raw milk from bovine mastitis by culture-independent

- PCR-DGGE method[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2009, 45: 76-81.
- [5] HAN Yanqing, XU Xinglian, JIANG Yun, et al. Inactivation of food spoilage bacteria by high pressure processing: evaluation with conventional media and PCR-DGGE analysis[J]. *Food Research International*, 2010, 43: 1719-1724.
- [6] ERCOLINI D, RUSSO F, TORRIERI E, et al. Changes in the spoilage-related microbiota of beef during refrigerated storage under different packaging conditions[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72: 4663-4667.
- [7] JIANG Yun, GAO Feng, XU Xinglian, et al. Changes in the bacterial communities of vacuum-packaged pork during chilled storage analyzed by PCR-DGGE[J]. *Meat Science*, 2010, 86: 889-895.
- [8] JIANG Yun, GAO Feng, XU Xinglian, et al. Changes in the composition of the bacterial flora on tray-packaged pork during chilled storage analyzed by PCR-DGGE and real-time PCR[J]. *Journal of Food Science*, 2011, 76: M27-M33.
- [9] LERMAN L S, FISCHER S G, HURLEY I, et al. Sequence determined DNA separations[J]. *Annual Review of Biophysics and Bioengineering*, 1984, 13: 399-423.
- [10] MYERS R M, FISCHER S G, LERMAN L S, et al. Nearly all single base substitutions in DNA fragments joined to a GC-clamp can be detected by denaturing gradient gel electrophoresis[J]. *Nucleic Acids Research*, 1985, 13: 3131-3145.
- [11] JACKSON C R, RODEN E E, CHURCHILL P F. Changes in bacterial species composition in enrichment cultures with varying inoculum dilution as monitored by denaturing gradient gel electrophoresis[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, 64: 5046-5048.
- [12] SEKIGUCHI H, TOMIOKA N, NAKAHARA T, et al. A single band does not always represent single bacterial strains in denaturing gradient gel electrophoresis analysis[J]. *Biotechnology Letters*, 2001, 23: 1205-1208.
- [13] PANG Xiaoyan, DING Dezhong, WEI Guifang, et al. Molecular profiling of *Bacteroides* spp. in human feces by PCR-temperature gradient gel electrophoresis[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2005, 61: 413-417.
- [14] DE ARAÚJO J C, SCHNEIDER R P. DGGE with genomic DNA: Suitable for detection of numerically important organisms but not for identification of the most abundant organisms[J]. *Water Research*, 2008, 42: 5002-5010.
- [15] LI Zhiyong, HE Liming, WU Jie, et al. Bacterial community diversity associated with four marine sponges from the South China Sea based on 16S rDNA-DGGE fingerprinting[J]. *Marine Biological Ecology*, 2006, 329: 75-85.
- [16] LANE D J. 16S/23S rRNA sequencing[M]//STACKEBRANDT E R, GOODFELLOW M. *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. Chichester, United Kingdom: John Wiley & Sons Ltd., 1991: 115-175.
- [17] WILSON K H, BLITCHINGTON R B, GREENE R C. Amplification of bacterial 16S ribosomal DNA with polymerase chain reaction[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 1990, 28: 1942-1946.
- [18] NÜBEL U, ENGELN B, FELSKA A, et al. Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNAs in *Paenibacillus polymyxa* detected by temperature gradient gel electrophoresis [J]. *Journal of Bacteriology*, 1996, 178: 5636-5643.
- [19] ALTSCHUL S F, MADDEN T L, SCHAFER A A, et al. Gapped Blast and Psiblast: a new generation of protein database search programs [J]. *Nucl Acids Res*, 1997, 25: 3389-3402.
- [20] ERCOLINI D. PCR-DGGE fingerprinting: novel strategies for detection of microbes in food[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2004, 56: 297-314.
- [21] WATANABE K, KODAMA Y, HARAYAMA S. Design and evaluation of PCR primers to amplify bacterial 16S ribosomal DNA fragments used for community fingerprinting[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2001, 44: 253-262.
- [22] GUAN L L, HAGEN K E, TANNOCK G W, et al. Detection and identification of *Lactobacillus* species in crops of broilers of different ages by using PCR-denaturing gradient gel electrophoresis and amplified ribosomal DNA restriction analysis[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69: 6750-6757.
- [23] 苏勇. 16S rRNA基因分子技术研究仔猪胃肠道菌群区系变化[D]. 南京: 南京农业大学, 2007: 52-58.
- [24] KISAND V, WIKNER J. Limited resolution of 16S rDNA DGGE caused by melting properties and closely related DNA sequences[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2003, 54: 183-191.
- [25] BELLINGHAM N F, MORGAN J A W, GORRIS L G M. Flagellin gene sequence variation in the genus *Pseudomonas*[J]. *Systematic and Applied Microbiology*, 2001, 24: 157-165.
- [26] HILARIO E, BUCKLEY T R, YOUNG J M. Improved resolution of the phylogenetic relationships among *Pseudomonas* by the combined analysis of *atpD*, *carA*, *recA* and 16S rDNA[J]. *Antonie Leeuwenhoek*, 2004, 86: 51-64.
- [27] YAMAMOTO S, KASAI H, ARNOLD D L, et al. Phylogeny of the genus *Pseudomonas*: intragenic structure reconstructed from the nucleotide sequences of *gyrB* and *rpoD* genes[J]. *Microbiology*, 2000, 146: 2385-2394.
- [28] WALTER J, TANNOCK G W, TILSALA-TIMISJARVI A, et al. Detection and identification of gastrointestinal *Lactobacillus* species by using denaturing gradient gel electrophoresis and species-specific PCR primers[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66: 297-303.
- [29] 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.