

# 长双歧杆菌婴儿亚种的快速区分

李明洁, 杨波\*, 赵建新, 张灏, 陈卫

(江南大学 食品学院, 江苏 无锡, 214122)

**摘要** 为建立一种有效、快速、低成本区分长双歧杆菌婴儿亚种的方法,对13株基因组测定的长双歧杆菌构建了基于同源基因的系统进化树,确认其中7株为长亚种,5株为婴儿亚种,1株为猪亚种。通过碳水化合物利用谱比较和特异性基因扩增的手段确认可有效用于快速区分长双歧杆菌婴儿亚种的方法。结果显示,同一亚种的菌株利用同一种碳水化合物的能力存在差异,表明无法根据碳水化合物的利用来区分长双歧杆菌的不同亚种;长双歧杆菌长亚种糖激酶基因和长双歧杆菌婴儿亚种唾液酸酶基因可有效用于长双歧杆菌婴儿亚种的快速区分,并用该方法对40株长双歧杆菌进行了亚种确认,其中5株为长双歧杆菌婴儿亚种。后随机选择了其中的4株菌进行基因组草图测序,经系统进化树构建,确认为长双歧杆菌婴儿亚种,并进一步证实特异性基因扩增可实现长双歧杆菌婴儿亚种的快速区分。

**关键词** 长双歧杆菌;亚种;区分;碳水化合物利用;特异性基因扩增

长双歧杆菌是在人体肠道微生物群中最广泛存在的一种双歧杆菌<sup>[1]</sup>,具有防治便秘<sup>[2]</sup>、抑制肠道致病菌<sup>[3]</sup>、调节肠道平衡、降低胆固醇<sup>[4]</sup>、促进营养物质的消化吸收、延缓衰老<sup>[5]</sup>和增强机体免疫活性<sup>[6-7]</sup>等生理功能。长双歧杆菌可分为3个亚种,即长双歧杆菌长亚种、长双歧杆菌婴儿亚种和长双歧杆菌猪亚种<sup>[8]</sup>,这3个亚种在生理生化特性以及遗传进化方面十分相近,常用的16S rRNA菌种鉴定的方法无法实现这3个亚种的区分<sup>[9-10]</sup>。目前多使用全基因组测序及系统发育树<sup>[11-13]</sup>、PCR-RFLP<sup>[14]</sup>、PCR-DGGE<sup>[15]</sup>、多位点序列分析(MLSA)、扩增片段长度多态性分析(AFLP)<sup>[16]</sup>、多位点测序分型(MLST)<sup>[17]</sup>等方法来区分不同亚种,但这些方法过程复杂,耗时长,成本高。《伯杰氏系统细菌学手册》中记录了长双歧杆菌的不同亚种对碳水化合物利用能力存在显著差异,这或许可作为区分不同亚种的依据。此外,利用基因型差异来区分亚种的方法也更加可靠,已有研究者尝试采用特异性基因扩增的方法进行一些细菌的亚种区分,该方法过程简单、快速,但需要找到能够可靠区分不同亚种的特异性基因<sup>[18-21]</sup>。

因此,本研究拟利用碳水化合物利用谱测定、特

异性基因扩增等手段,确认一种有效、快速、低成本的区分方法,以实现长双歧杆菌的亚种区分。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

#### 1.1.1 实验菌株

本文所用54株长双歧杆菌,均保存于江南大学食品生物技术研究中心菌种库(表1)。其中ATCC15697为长双歧杆菌婴儿亚种,13株已测定了基因组但亚种未知,其余40株亚种未知且无基因组序列。

表1 本文所用长双歧杆菌

Table 1 *Bifidobacterium longum* in this study

菌株号	基因组 测序	菌株号	基因组 测序	菌株号	基因组 测序
CCFM685	是	FGSYC85M1	否	FHuNCS3M9	否
CCFM686	是	FJLHD17M1	否	FHuNCS6M8	否
CCFM752	是	FXJSW41R12	否	FZJHZ3M3	否
CCFM756	是	FXJKS50M3	否	FHuNCS1L4	否
CCFM762	是	FJSWX32M3	否	FSDWF3M1	否
FGZ611M6	是	FHuNMY3M4	否	FJND12M3	否
FGZ1611M5	是	JSWX38M1	否	FFJND18M2	否
FHeNJZ44M8	是	HeNJZ8M1	否	FZJHZ15M2	否
M2-03-F02-27	是	FSDHZD2L8	否	FZJHZ16M1	否
ATCC15697	是	FBJHD2M2	否	FJSSZ6M3	否
FGZ1711M1	是	NMGEL2M6	否	FXJWS32M1	否
FGZ1911M3	是	FJND16M4	否	FHNFQ59M1	否
FGZ2311M2	是	JSZJ4M3	否	FGZ1311M1	否
CCFM688	是	JSSZ7M7	否	FGZ1411M1	否
FHNQF28M5	否	JSNJ1M4	否	FXJSW42R14	否
FXJWS41M1	否	FJND15M4	否	FXJSW50R18	否
FJSSZ4M2	否	BJCY1M3	否	JSYC2M1	否
FZJHZ4M6	否	FZJHZ13M3	否	FHNXY43M6	否

第一作者:本科生(杨波副研究员为通讯作者,E-mail:bo.yang@jiangnan.edu.cn)。

基金项目:国家自然科学基金(31771953,31820103010);江苏高校品牌专业建设工程项目(PPY2015A052);BINC营养与护理研究基金(BINCMCF1201)

收稿日期:2019-05-14,改回日期:2019-05-31

1.1.2 培养基与试剂

改良 MRS (modified MRS, mMRS) 培养基: 蛋白胨 10 g; 牛肉膏 10 g; 酵母粉 5 g; 葡萄糖 20 g; 乙酸钠 5 g; 吐温 80 1 mL;  $K_2HPO_4$  2.0 g; 柠檬酸氢二铵 2.0 g;  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.1 g;  $MnSO_4 \cdot H_2O$  0.05 g; *L*-半胱氨酸盐酸盐 0.5 g; 蒸馏水 1 L; pH 6.2 ~ 6.4; 115 ℃ 灭菌 20 min。

不同碳水化合物替代葡萄糖的培养基: 用不同的碳水化合物 (终质量浓度为 10 g/L) 替代 mMRS 培养基中的葡萄糖, 并添加 0.5% 溴甲酚紫母液 15 mL/L;

作为阴性对照培养基: mMRS 培养基添加 0.5% 溴甲酚紫母液 15 mL/L;

2 × Taq Plus MasterMix, 康为世纪生物科技有限公司; GeneRuler DNA Ladder Mix, 英潍捷基; HGV-II 核酸染液, 北京赛百盛基因技术有限公司; 琼脂糖, 生工生物工程股份有限公司。

1.2 仪器与设备

AW500SG 型 Electrotek 厌氧工作站, 英国依莱泰科; GR60DA 立式自动压力蒸汽灭菌器, 致微 (厦门) 仪器有限公司; SW-CJ-1FD 洁净工作台, 苏州安泰空气技术有限公司; C1000 Touch™ 型基因扩增仪, 美国 Bio-Rad 公司; DYCP-31DN/DYCP-32B 水平电泳仪, 北京六一生物科技有限公司; Gel Doc™ EZ imager 凝胶成像系统, 美国 Bio-Rad 公司。

1.3 方法

1.3.1 系统发育树的构建

采用 orthomclV2.0.9 软件对不同菌株的直系同源基因进行分析<sup>[22-23]</sup>, 根据同源基因分析结果, 提取所有菌株的直系同源基因序列, 利用 mafft-7.313 软件对不同菌株的直系同源基因进行序列比对<sup>[22,24]</sup>, 基于序列比对结果, 进行进化分析构建系统发育树。

1.3.2 菌株的活化

将保藏于甘油中的菌株划线至 mMRS 固体培养基 37 ℃ 厌氧培养 48 h, 后挑取单菌落接种至 5 mL mMRS 液体培养基中, 37 ℃ 厌氧培养 48 h, 液体连续活化 2 代。

1.3.3 碳水化合物利用能力比较

将 200 μL 不同碳水化合物替代葡萄糖的培养基和阴性对照的培养基分装于无菌 96 孔板中, 分别接种 2 次活化后的 2 μL 菌液至 96 孔中, 每个菌每种碳水化合物测 2 个平行孔, 培养 48 h 后观察孔板中培养基颜色变化及菌株生长情况。碳水化合物利用能力比较实验重复 3 遍测定。

1.3.4 不同亚种的特异性基因分析

本文所有引物信息如表 2 所示。PCR 反应体系 (20 μL): 模板 1 μL, 上、下游引物各 0.5 μL, 2 × Taq MasterMix 10 μL, ddH<sub>2</sub>O 8 μL。PCR 条件: 95 ℃ 预变性 5 min, 95 ℃ 变性 35 s, 60 ℃ 退火 35 s, 72 ℃ 延伸 40 s, 从变性到延伸需要重复 30 个循环, 最后 72 ℃ 补充延伸 10 min。PCR 产物进行 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳, 于凝胶成像分析仪中观察条带情况。实验重复 3 次确保引物具有良好的重复性。

表 2 PCR 引物  
Table 2 PCR primers

亚种名称	特异性基因	引物名称	序列 (5'-3')	片段长度/bp	参考文献
长双歧杆菌长亚种	<i>MarR</i> family transcriptional regulator	MarR-F	ATCCTCAACCAATGCGTTCC	168	[20]
		MarR-R	GGCTTGTTCCAGCAGTTTGA		
	Tellurite resistance protein <i>TerB</i>	TerB-F	TGAGGGTGTGTGATGCAGTCT	156	[20]
		TerB-R	ATCGTCCGGGCAATATGTCT		
	<i>Sugar kinase</i> gene	lon_F	GAGGCGATGGTCTGGAAGTT	181	[18]
		lon_R	CCACATCGCCGAGAAGATTC		
	<i>Tuf</i> gene	BloF	GTATCCGTCCGACCCAGCAG	161	[21]
		BloR	GGTGACGGAGCCCGGCTTG		
	<i>Glyoxalase</i>	Glyoxalase-F	GCTTTGCAGACAGTTGAAAC	176	[20]
		Glyoxalase-R	CGCTGTCCCCATGAATGTTTC		
	<i>ABC-2</i> type transporter	ABC-F	AGCGGACAGGTACATTGGAA	177	[20]
		ABC-2	CCAATATGAGTTGCCACGGG		
长双歧杆菌婴儿亚种	<i>Sialidase</i> gene	inf_F	ATACAGCAGAACCTTGGCCT	234	[18]
		inf_R	GCGATCATATGGACGAGAAC		
	<i>Tuf</i> gene	Binf-tF	ATCCGTCCGACCCAGACC	123	[21]
		Binf-tR	CTCGACATCCTCACGGCC		
长双歧杆菌猪亚种	<i>Serine/threonine</i> protein kinase	Serine-F Serine-R	GCAACTCGAGGATTCCGAC AACGGATTGGTGGTTTGCTC	166	[20]

1.3.5 长双歧杆菌菌株的亚种确认

利用亚种特异性引物对 40 株亚种未知的长双歧杆菌进行 PCR 扩增,根据扩增产物电泳后条带情况区分长双歧杆菌的不同亚种。并选择扩增结果为婴儿亚种的菌株送至上海美吉生物医药科技有限公司进行基因组草图扫描,并构建系统进化树,以验证其为长双歧杆菌婴儿亚种。

2 结果与分析

2.1 13 株已测基因组菌株的亚种确认

从 NCBI 数据库 (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/) 中获取已确认亚种的长双歧杆菌长亚种、长双歧杆菌婴儿亚种、长双歧杆菌猪亚种菌株的基因组序列(各 10 个),与本团队前期已测全基因组但尚未确认亚种的 13 株长双歧杆菌进行直系同源基因分析,共获得核心基因 941 个,基于这些核心基因,构建了 43 株菌系统发育树(图 1)。

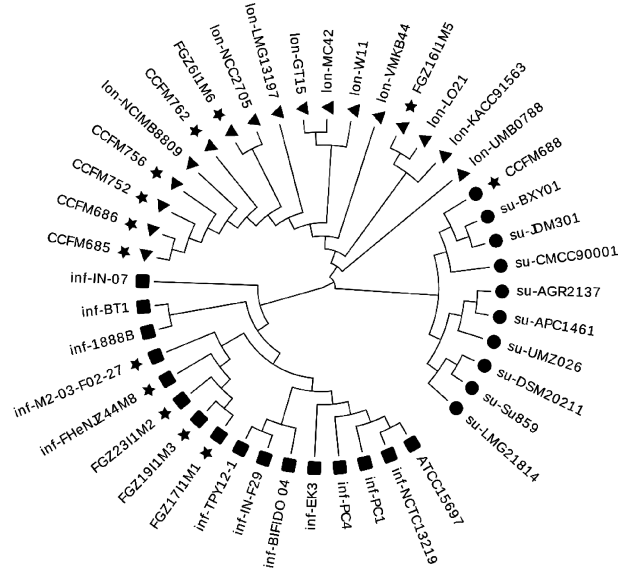


图 1 基于 43 株长双歧杆菌核心基因构建系统发育树  
Fig. 1 Phylogenetic tree of 43 *Bifidobacterium longum* based on core genes

注:“■”为长双歧杆菌婴儿亚种;“▲”为长双歧杆菌长亚种;“●”为长双歧杆菌猪亚种;“★”为已测定全基因组但尚未确认亚种的长双歧杆菌。

结果显示,30 株长双歧杆菌不同亚种分别位于不同分支上,而本团队前期已测基因组的 13 株菌分别属于 3 个不同亚种,其中 7 株是长双歧杆菌长亚种、5 株为长双歧杆菌婴儿亚种、1 株为长双歧杆菌猪亚种。

2.2 不同长双歧杆菌碳水化合物利用能力比较

根据《伯杰氏系统细菌学手册》及相关文献报

道<sup>[25-26]</sup>选择了长双歧杆菌不同亚种利用能力存在显著差异的 6 种碳水化合物进行实验,包括阿拉伯糖、木糖、核糖、葡萄糖醛酸钠、甘露糖和岩藻糖,以进一步确认长双歧杆菌不同亚种碳水化合物利用谱差异。

结果显示,所测定的长双歧杆菌长亚种、长双歧杆菌婴儿亚种、长双歧杆菌猪亚种共 14 株菌利用不同碳水化合物产酸能力存在差异(表 3)。3 个亚种均可利用核糖和岩藻糖;长双歧杆菌长亚种和长双歧杆菌猪亚种不能利用葡萄糖醛酸钠,而长双歧杆菌婴儿亚种 FHeNJZ44M8、M2-03-F02-27 和 ATCC15697 三株菌可利用葡萄糖醛酸钠,其余 3 株却不能利用;长双歧杆菌长亚种中除 FGZ1611M5 外,均可利用阿拉伯糖和木糖产酸。同一亚种的菌株利用同一种碳水化物的能力存在差异,故根据不同碳水化合物利用能力的差异难以实现长双歧杆菌不同亚种的区分。

表 3 长双歧杆菌不同亚种的碳水化合物利用比较

Table 3 Carbohydrate utilization capacity of different

*Bifidobacterium longum* strains

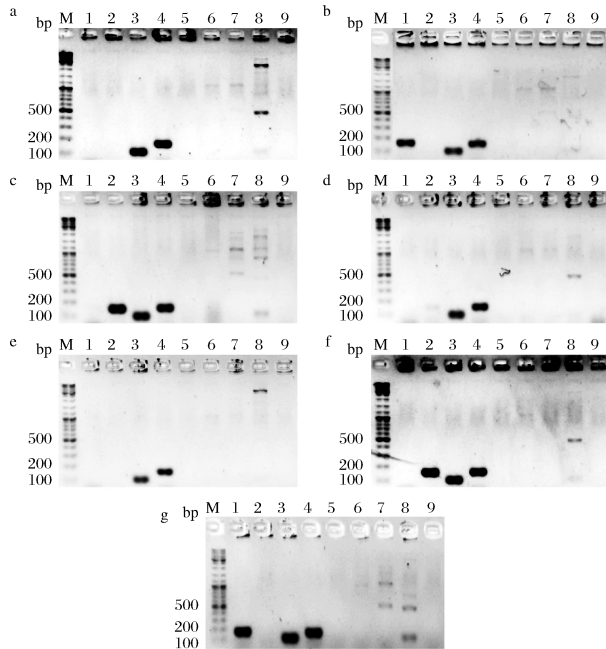
亚种	菌株	阿拉伯糖	木糖	核糖	葡萄糖醛酸钠	甘露糖	岩藻糖
长双歧杆菌长亚种	CCFM685	+	+	+	-	-	+
	CCFM686	+	+	+	-	-	+
	CCFM752	+	+	+	-	+	+
	CCFM756	+	+	+	-	+	+
	CCFM762	+	+	+	-	+	+
长双歧杆菌婴儿亚种	FGZ611M6	+	+	+	-	+	+
	FGZ1611M5	-	-	+	-	+	+
	FHeNJZ44M8	-	-	+	+	+	+
	M2-03-F02-27	-	-	+	+	+	+
	ATCC15697	-	-	+	+	-	+
	FGZ1711M1	-	-	+	-	+	+
	FGZ1911M3	-	-	+	-	+	+
长双歧杆菌猪亚种	FGZ2311M2	-	-	+	-	+	+
	CCFM688	+	+	+	-	+	+

注:“+”代表菌株利用该碳水化合物产酸;“-”代表菌株未利用该碳水化合物产酸。

2.3 不同亚种的特异性基因分析

根据相关文献报道选择了 9 个亚种特异性基因(表 2),对 14 株亚种确认的长双歧杆菌基因组 DNA 进行扩增,以评价这个特异性基因的有效性。*MarR* 基因是长双歧杆菌长亚种的特异性基因,理论扩增条带为 168 bp,但 7 株长双歧杆菌长亚种的扩增结果显示,仅 CCFM762(图 2-b)、CCFM756(图 2-g)可成功扩增出 168 bp 的条带,其余长亚种菌株无扩增产物;*TerB* 基因的扩增结果也类似,仅 CCFM685(图 2-c)、

CCFM686(图 2-d)和 FGZ1611M5(图 2-f)可扩增出正确大小的条带(156 bp),其余长亚种菌株均没有扩增产物,因此,这 2 个基因无法用于长双歧杆菌长亚种的区分。尽管所有长亚种菌株可扩增出 *Sugar kinase* 基因(图 2),婴儿亚种菌株也不能扩增出该基因(图 3),但猪亚种同样扩增出该基因(图 4),因此,该基因也无法区分长亚种和猪亚种,但可用于长双歧杆菌婴儿亚种的确认。所有长亚种菌株(图 2)和猪亚种菌株(图 4)可扩增出长亚种 *Tuf* 基因,而婴儿亚种菌株(图 3)也可扩增出条带,该基因无法快速区分不同亚种。



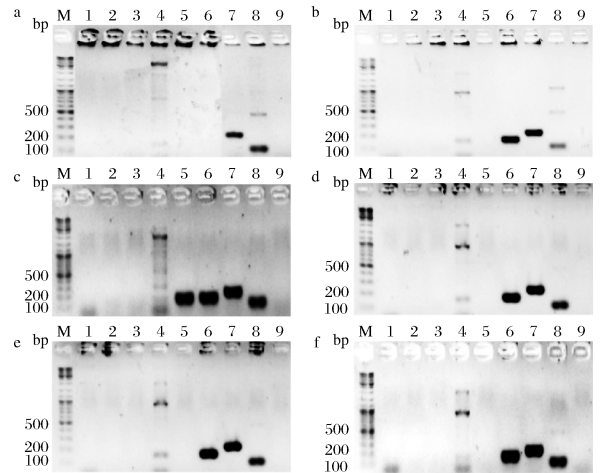
a ~ g-FGZ611M6、CCFM762、CCFM685、CCFM686、  
CCFM752、FGZ1611M5、CCFM756

图 2 长双歧杆菌长亚种菌株 PCR 电泳结果

Fig. 2 PCR electrophoresis results of *B. longum*  
subsp. *longum*

注: M-DNA Marker; 1~9 表示分别用 MarR、TerB、lon、Blo、  
Glyoxalase、ABC、inf、Binf、Serine 引物扩增。下同。

*Glyoxalase* 基因是长双歧杆菌婴儿亚种的特异性基因,理论扩增条带为 168 bp,但 6 株长双歧杆菌婴儿亚种的扩增结果显示,只有 ATCC15697(图 3-c)可扩增出 168 bp 的条带,其余婴儿亚种菌株没有扩增产物;*ABC* 基因的结果也类似,M2-03-F02-27(图 3-a)没有扩增产物,因此,这 2 个基因无法用于长双歧杆菌婴儿亚种的区分。*Sialidase* 基因的扩增结果显示,仅长双歧杆菌婴儿亚种菌株可成功扩增得到正确大小的条带(图 3),而长双歧杆菌长亚种(图 2)和长双歧杆菌猪亚种(图 4)均无扩增产物,因此,*Sialidase* 基



a ~ f-M2-03-F02-27、FHeNJZ44M8、ATCC15697、  
GZ1711M1、GZ1911M3、GZ2311M2

图 3 长双歧杆菌婴儿亚种菌株 PCR 电泳结果

Fig. 3 PCR electrophoresis results of *B. longum*  
subsp. *infantis*

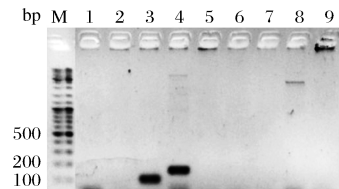


图 4 长双歧杆菌猪亚种菌株 PCR 电泳结果

Fig. 4 PCR electrophoresis results of *B. longum* subsp. *suis*

因可用于长双歧杆菌婴儿亚种的快速区分。婴儿亚种 *Tuf* 基因是长双歧杆菌婴儿亚种的特异性基因,该基因理论扩增条带为 123 bp,但所用 14 株菌的扩增结果显示,长双歧杆菌长亚种 FGZ611M6(图 2-a)、CCFM685(图 2-c)、CCFM756(图 2-g)和长双歧杆菌婴儿亚种菌株(图 3)均可以扩增出 100 bp 左右的条带,因此,该基因的区分效果同样不佳。而猪亚种的特异性基因 *Serine*,理论扩增条带为 166 bp,但扩增结果显示,CCFM688(图 4)没有扩增产物,鉴于菌株数量太少,还需进一步确认。

为了解析不同基因扩增效果的差异,进一步利用 Primer-BLAST(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>)来分析引物的特异性(表 4)。结果显示,*MarR* 和 *TerB* 的引物只能扩增出长双歧杆菌长亚种菌株,但扩增出的菌株数较少,说明基因的特异性过强,可能不能广泛区分长亚种;*Sugar kinase* 和长亚种 *Tuf* 基因的引物可扩增出长双歧杆菌长亚种和猪亚种,也就解释了这两个基因均无法实现长亚种和猪亚种的区分的原因,且长亚种 *Tuf* 基因可扩增出多个

不同大小的片段;基因 *Glyoxalase* 和基因 ABC Primer-BLAST 只能扩增出部分长双歧杆菌婴儿亚种,基因的特异性较强,不能广泛用于区分婴儿亚种;*Sialidase* 基因可扩增出全部长双歧杆菌婴儿亚种,基因的特异

性较好;婴儿亚种 *Tuf* 基因可扩增出全部长双歧杆菌婴儿亚种,但可扩增出多个不同大小的片段;基因 *Serine* Primer-BLAST 只能扩增出部分长双歧杆菌猪亚种,无法实现猪亚种的区分。

表 4 特异性基因 Primer-BLAST 结果  
Table 4 The Primer-BLAST results of specific genes

亚种	基因名称	Primer-BLAST 结果		
		长双歧杆菌长亚种	长双歧杆菌婴儿亚种	长双歧杆菌猪亚种
长双歧杆菌长亚种	<i>MarR</i>	44	-	-
	<i>TerB</i>	44	-	-
	<i>Sugar kinase</i>	100	-	100
	<i>Tuf</i>	100	-	100
长双歧杆菌婴儿亚种	<i>Glyoxalase</i>	-	50	-
	<i>ABC</i>	-	50	-
	<i>Sialidase</i>	-	100	-
	<i>Tuf</i>	-	100	-
长双歧杆菌猪亚种	<i>Serine</i>	-	-	33

注:表中数字为引物扩增出的菌株数占该亚种菌株总数的比例;“-”表示引物未扩增出该亚种菌株。

综上可知,长双歧杆菌长亚种糖激酶基因和长双歧杆菌婴儿亚种唾液酸酶基因可有效实现长双歧杆菌婴儿亚种与其他两亚种的区分,根据扩增产物电泳后条带的有无及大小初步实现长双歧杆菌婴儿亚种的区分。若婴儿亚种唾液酸酶基因扩增产物电泳后产生 234 bp 左右的条带且长亚种糖激酶基因扩增产物电泳后无条带产生,则该菌株可初步确认为长双歧杆菌婴儿亚种。

2.4 长双歧杆菌婴儿亚种的确认

采用上述区分效果较好的长双歧杆菌长亚种糖激酶基因和长双歧杆菌婴儿亚种唾液酸酶基因进行 PCR 扩增,对 40 株亚种未知的长双歧杆菌进行了 PCR 扩增,电泳后的条带结果显示,HeNJZ8M1、FJND16M4、JSSZ7M7、FHuNCS6M8 和 JSYC2M1 共 5 株菌为长双歧杆菌婴儿亚种,其余 35 株菌均为长双歧杆菌长亚种或猪亚种(图 5)。

为进一步验证目前所确认亚种的准确性,从 5 株新确认的长双歧杆菌婴儿亚种中随机选择了 4 株,即 HeNJZ8M1、FHuNCS6M8、FJND16M4、JSSZ7M7 寄送上海美吉生物医药科技有限公司进行基因组草图测序。并将上述 4 株菌与图 1 中 43 株菌合并进行同源基因分析,共获得 938 个核心基因。基于这些核心基因,构建了该 47 株菌系统发育树(图 6)。结果显示,经特异性基因扩增确认为长双歧杆菌婴儿亚种的 4 株菌(HeNJZ8M1、FHuNCS6M8、FJND16M4 和 JSSZ7M7)

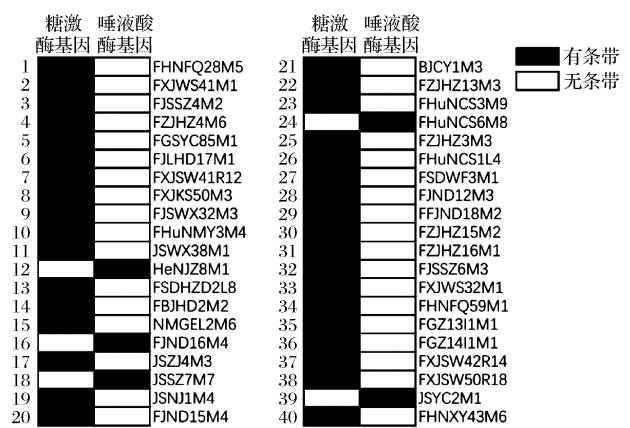


图 5 40 株长双歧杆菌 PCR 电泳结果  
Fig.5 PCR electrophoresis results of 40 *Bifidobacterium longum*

确为长双歧杆菌婴儿亚种,进一步证实了基于长双歧杆菌长亚种糖激酶基因和长双歧杆菌婴儿亚种唾液酸酶基因的特异性扩增可有效实现长双歧杆菌婴儿亚种的快速区分。

3 结论

本研究对 13 株已测定基因组的长双歧杆菌经生物信息学分析确认了亚种,其中 7 株为长双歧杆菌长亚种,5 株为长双歧杆菌婴儿亚种,1 株为长双歧杆菌猪亚种。对亚种确认的长双歧杆菌进行了碳水化合物利用谱比较,但碳水化合物利用谱难以实现不同亚



- Applied and Environmental Microbiology, 2002, 68(5): 2 420 – 2 427.
- [16] YANOKURA E, OKI K, MAKINO H, et al. Subspeciation of *Bifidobacterium longum* by multilocus approaches and amplified fragment length polymorphism: Description of *B. longum* subsp. *suillum* subsp. nov., isolated from the faeces of piglets[J]. Systematic and Applied Microbiology, 2015, 38(5): 305 – 314.
- [17] 张秋雪, 刘晓婵, 朱宗涛, 等. 婴儿粪便长双歧杆菌的分离与多样性分析[J]. 食品科学, 2017, 38(24): 14 – 20.
- [18] LAWLEY B, MUNRO K, HUGHES A, et al. Differentiation of *Bifidobacterium longum* subspecies *longum* and *infantis* by quantitative PCR using functional gene targets[J]. Peerj, 2017, 5: e3375.
- [19] LAWLEY B, CENTANNI M, WATANABE J, et al. *Tuf* gene sequence variation in *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* detected in the fecal microbiota of Chinese infants[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2018, 84(13): e00336 – 18.
- [20] FERRARIO C, MILANI C, MANCABELLI L, et al. A genome-based identification approach for members of the genus *Bifidobacterium*[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2015, 91(3): fiv009.
- [21] SHEU S, HWANG W, CHIANG Y, et al. Use of *Tuf* gene-based primers for the PCR detection of probiotic *Bifidobacterium* species and enumeration of *Bifidobacteria* in fermented milk by cultural and quantitative real-time PCR methods[J]. Journal of Food Science, 2010, 75(8): M521-M527.
- [22] 闫爽. 长双歧杆菌遗传与表型多样性及其与免疫调节功能的相关性研究[D]. 无锡: 江南大学, 2019.
- [23] CHEN F, MACKEY A J, STOECKERTJR C J, et al. OrthoMCL-DB: Querying a comprehensive multi-species collection of ortholog groups[J]. Nucleic Acids Research, 2006, 34(S1): D363-D368.
- [24] KATO H, STANDLEY D M. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: Improvements in performance and usability[J]. Molecular Biology and Evolution, 2013, 30(4): 772 – 780.
- [25] 冯仕云, 龚萍, 蒋德意, 等. 婴儿双歧杆菌 BI-G201 的分离与鉴定[J]. 生物化工, 2016, 2(6): 41 – 43; 46.
- [26] SAKATA S, KITAHARA M, SAKAMOTO M, et al. Unification of *Bifidobacterium infantis* and *Bifidobacterium suis* as *Bifidobacterium longum*[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2002, 52(6): 1 945 – 1 951.

## Rapid identification of *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis*

LI Mingjie, YANG Bo<sup>\*</sup>, ZHAO Jianxin, ZHANG Hao, CHEN Wei

(School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

**ABSTRACT** The aim of the current research was to establish an effective, rapid and low – cost method to identify *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis*. The subspecies of 13 genomes sequenced *B. longum* strains were confirmed according to the phylogenetic tree based on orthologous genes in 13 subspecies, seven strains were *B. longum* subsp. *longum*, five strains were *B. longum* subsp. *infantis* and one was *B. longum* subsp. *suis*. A method for rapidly distinguishing *B. longum* subsp. *infantis* was confirmed by analyzing their carbohydrate utilization capacity and amplification of specific genes. The results indicated that it was impossible to distinguish subspecies based on carbohydrate utilization capacity due to strains from each subspecies were different. As comparison, the sugar kinase genes in *B. longum* subsp. *longum* and sialidase genes in *B. longum* subsp. *infantis* could be efficiently used for distinguishing *B. longum* subsp. *infantis*. With this method, five strains of *B. longum* subsp. *infantis* were identified from 40 strains of *B. longum*. Four of the five strains of *B. longum* subsp. *infantis* were randomly selected and further confirmed as *B. longum* subsp. *infantis*. Therefore, this study verifies that *B. longum* subsp. *infantis* can be rapidly distinguished by amplifying specific genes.

**Key words** *Bifidobacterium longum*; subspecies; distinguish; carbohydrate utilization; specific genes amplicon