

网络出版时间:2025-02-06 15:19:05 网络出版地址:https://link.cnki.net/urlid/34.1065.R.20250206.1137.009

动物双歧杆菌 B4 株的全基因组测序及其益生特性分析

丁瑞培¹,刘承忠²,史灿灿²,张慧玉¹,代宜萍²,穆如雪²,李子龙²,何茂章²,李卓君³

(安徽医科大学¹ 第一临床医学院、² 基础医学院微生物学教研室,合肥 230032;

³ 南昌大学抚州医学院基础医学部,抚州 344000)

摘要 目的 分析由健康人粪便中新分离出一株动物双歧杆菌 B4 株的全基因组信息,并探究其益生特性。方法 采用体外实验方法对动物双歧杆菌 B4 的耐药性、溶血性、耐胃酸特性以及生化特性进行评估,并利用二代+三代测序技术对该菌进行全基因组测序以及基因功能注释。结果 经全基因组测序后显示该动物双歧杆菌 B4 株基因组大小为 1 944 146 bp,GC 含量为 60.49%,不含质粒,总基因数为 1 642 个。体外实验分析结果显示,该动物双歧杆菌 B4 株具有良好的益生特性,包括非溶血性和耐胃酸的特性。同时基因组结果显示,该动物双歧杆菌 B4 株不具有毒素、致病相关基因,耐药基因少且传播能力不高,具有很高的安全性。通过 KEGG、COG、GO 等基因注释显示其含有很多生物活性酶,如 β -半乳糖苷酶、L-乳酸脱氢酶等益生基因。结论 该动物双歧杆菌 B4 株具有良好的益生特性,在基因层面上展示了优良的安全性,具有益生特性的基因序列。

关键词 动物双歧杆菌;分离培养;全基因组测序;基因组分析;益生菌;益生基因

中图分类号 Q 939.93

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2025)02-0255-11

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2025.02.010

益生菌是一类主要在胃肠道中用于改善微生物平衡的活的非致病性微生物,已被证明在预防和治疗多种疾病(特别是涉及胃肠道)方面有功效^[1-2]。双歧杆菌作为一种益生菌,最初是从母乳喂养的婴儿粪便中分离出来的,是一类具有高 GC 含量 DNA 的革兰阳性严格厌氧菌,常呈弯曲杆状、L 状、V 状或 Y 状等多种形态^[3]。动物双歧杆菌乳亚种是动物双歧杆菌的一种,能够增强肠道屏障功能^[4],提高机体免疫力^[5],抑制病原体的生长^[6],显著改善肠道功能,尤其对腹泻具有良好的缓解作用^[7]。近年来出现不少关于动物双歧杆菌治疗肥胖症^[8-9]以及糖尿病^[6,10]的报道,动物双歧杆菌在临床的应用越来越密切。同时,很多具有强大益生特性的动物双歧杆菌乳亚种被发现,例如 BB-12^[6]、HN019^[11]

等。该研究利用形态学观察、16S rRNA 基因检测等方法在健康人粪便中分离筛选出一株动物双歧杆菌乳亚种,并进行了药敏试验、溶血实验、生化实验和耐胃酸实验等体外实验。基于 illumina 和 PacBio Sequel 平台对该动物双歧杆菌 B4 株进行全基因组二代+三代测序,包括基因功能注释、系统发育关系和基因组分结构等方面做出分析,在基因水平上为发掘其益生特性提供理论依据和研究支持。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种来源 本实验的动物双歧杆菌 B4 株是从健康人粪便中分离筛选出来的,在 MRS 培养基中 37 °C 厌氧静置培养 24~48 h,并经 10 000 r/min 离心 1 min 后弃上清液,磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline, PBS)洗 2 次后弃上清液,用 25% 丙三醇溶液混匀保存在 -80 °C 冰箱。

1.1.2 培养基 改良 MRS 培养基制备:10 g 蛋白胨、5 g 牛肉粉、4 g 酵母粉、20 g 葡萄糖、1 g 吐温-80、2 g 磷酸氢二钾、5 g 乙酸钠、2 g 柠檬酸三铵、5 g 醋酸钠、0.2 g 硫酸镁、0.05 g 硫酸锰、15 g 琼脂粉、1 000 ml 蒸馏水。将上述成分混合,加热溶解,校正 pH 6.2,分装,121 °C 高压灭菌 15~20 min 备用。

1.1.3 试剂与仪器 MRS 培养基、哥伦比亚血琼脂基础、乳酸菌成套生化鉴定管、脱纤维羊血(青岛

2024-09-20 接收

基金项目:国家自然科学基金青年基金项目(编号:82302568);江西省教育厅科学技术研究项目——一般项目(编号:GJJ2203414);安徽省自然科学基金青年项目(编号:2308085QH283);安徽省教育厅青年骨干教师境内访学研修资助项目(编号:gxjnfk2023003);安徽医科大学大学生创新创业项目(编号:202310366054)

作者简介:丁瑞培,男,本科生;

何茂章,男,博士,硕士生导师,通信作者,E-mail: hmz91@ahmu.edu.cn;

李卓君,女,硕士,讲师,通信作者,E-mail: 247732391@qq.com

海博生物技术有限公司)、细菌基因组 DNA 提取试剂盒[天根生化科技(北京)有限公司];改良 Gram-Weigert 革兰染色试剂盒、胃蛋白酶(北京索莱宝科技有限公司);盐酸(安徽医科大学基础医学院病原微生物教研室);抗菌药物药敏纸片(常德比克曼生物科技有限公司);2 × Taq Plus Master Mix2 (Dye Plus)、DL5000 DNA Marker、溶菌酶(北京宝日医生物技术有限公司);恒温培养箱(上海一恒科学仪器有限公司);超净工作台(苏州净化设备有限公司);离心机[大龙兴创实验仪器(北京)有限公司];Thermo NanoDrop ONE 超微量紫外分光光度计[科至达(北京)信息技术有限公司];T100 PCR 仪(上海艾研生物科技有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 菌种的分离与鉴定 挑选平板上的菌落制备细菌涂片,进行革兰染色镜检作为辅助鉴定。同时使用细菌 16S rRNA 通用引物(27F: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3', 1492R: 5'-GGT-TACCTTGTACGACTT-3')通过 PCR 扩增细菌 16S rRNA 基因。扩增结果进行 1% 琼脂糖凝胶电泳,再将 PCR 产物进行测序(擎科生物技术有限公司)。测序结果利用 NCBI 数据库和 BLAST 算法与数据库进行对比,并根据 16S rRNA 基因序列的相似性进行初步物种鉴定。

1.2.2 全基因组测序

1.2.2.1 DNA 提取与测序 为了进行全基因组测序,从纯化后的平板中挑取单个菌落混于 5 ml MRS 肉汤中,并在 37 °C 的厌氧条件下静置培养 24 h,然后将菌液在 4 °C 低温离心机,10 000 r/min 离心 1 min 后弃上清液,用无菌 PBS 洗涤后收集在同一个离心管里。根据细菌基因组 DNA 提取试剂盒的说明书提取后得到的 DNA 需要满足质量浓度 > 80 μg/μl,取 1 μl DNA 提取液在 NanoDrop ONE 测定其 260 nm 和 280 nm 波长下吸光度比值在 1.8 ~ 2.0,另取 10 μl DNA 提取液加入 1 μl 10 × loading buffer 后琼脂糖凝胶电泳跑胶条带清晰且无降解。符合条件的 DNA 提取液送苏州金唯智生物技术有限公司在 illumine PE150 平台上采用 PacBio 系统进行全基因组测序^[12-13]。

1.2.2.2 基因组的测序及组装 使用 Qubit 3.0 荧光仪(Invitrogen, Carlsbad, CA)对文库进行定量,并使用 Agilent 2100 生物分析仪(Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA)系统检查文库的大小和质量,检验合格的文库进行 cluster 制备和测序。随后用

DNA Template Prep 试剂盒构建 SMRTbell 文库,然后使用 PacBio Sequel 平台对文库进行测序。基于三代测序数据,使用软件 Hifiasm (version 0.13 - r308)^[14-15]、Hicanu (version 1.7)^[16]等进行组装,得到初步组装结果。使用二代测序数据质量统计软件 fastp (v0.23.0)^[17]对测序原始数据去除接头以及低质量序列等,得到后续信息分析用的纯净数据。然后用 Pilon 软件^[18]对 illumina 的原始基因组数据进行校正,得到最终的组装结果。使用工具 iTOL (<https://itol.embl.de/>)构建全基因组系统发育树。

1.2.2.3 基因组的功能注释及预测 利用软件 Prodigal (version 2.6.3)^[19]对编码基因进行预测;分别利用 tRNAscan 及 barrnap 软件预测 tRNA 及 rRNA 区域,通过与 Rfam (version 12.0)数据库进行序列比对获得其他非编码 RNA。基于预测得到的编码基因的蛋白序列,使用 BLAST (version 1.7.31 +)等比对软件与数据库中的蛋白序列进行比对,选取最优的匹配结果作为该基因的注释结果。然后用 NR 数据库注释物种信息,用 GO 数据库注释基因的功能,用 KEGG 数据库对通路进行注释,利用 COG 数据库对基因编码的蛋白进行系统发育分类,在 CAZy 数据库、Swiss_Prot 数据库、Pfam 数据库、CARD 数据库、VFDB 数据库或 DFFV 数据库中搜索蛋白质序列。使用工具 Proksee (<https://proksee.ca/>)构建全基因组序列基因圈图。

1.2.3 动物双歧杆菌体外实验

1.2.3.1 动物双歧杆菌 B4 的耐药性 使用 30 种抗生素(包括克林霉素、氯霉素、米诺环素、头孢唑啉、亚胺培南、左氧氟沙星、红霉素、阿奇霉素、头孢吡辛钠、头孢曲松、头孢他啶、诺氟沙星、氟苯尼考、环丙沙星、头孢哌酮、多西环素、氨苄西林、万古霉素、苯唑西林、哌拉西林、四环素、复方新诺明、头孢氨苄、链霉素、庆大霉素、青霉素、林可霉素、阿米卡星、多粘菌素 B、卡那霉素)制成的药敏纸片(常德比克曼生物科技有限公司),采用药敏纸片扩散法对 B4 菌进行药敏试验^[20]。在厌氧培养 24 h 的菌液重悬混匀后,取 200 μl 菌液涂布至 MRS 固体培养基,然后立即取药敏纸片置于平板上约 30 s 后倒置并贴封口膜(每个平板上可贴 2 ~ 5 个药敏纸片),置于 37 °C 保温箱厌氧静置培养 24 h 后观察是否有抑菌圈形成,并记录抑菌圈直径。判定标准参照美国实验标准委员会药敏纸片扩散法规则标准。

1.2.3.2 动物双歧杆菌 B4 的溶血性 使用哥伦比亚血琼脂基础、脱纤维羊血、维生素 K 配制血琼

脂平板,将新鲜培养 24 h 的动物双歧杆菌 B4 菌的菌液分离划线至现配制的血琼脂平板,37 °C 保温箱厌氧静置培养 24 h。若菌落周围形成透明的溶血圈,则证明动物双歧杆菌 B4 具有溶血性;若未形成透明溶血圈,而长成单个正常菌落,则证明其不具有溶血性。实验重复 3 次以上,以保证实验的可靠性。

1.2.3.3 动物双歧杆菌 B4 的生化特性 使用细菌生化反应管对动物双歧杆菌 B4 株的生化特性进行研究。包括对动物双歧杆菌 B4 株分解七叶苷、纤维二糖、麦芽糖、甘露醇、水杨苷、山梨醇、蔗糖、棉子糖、菊糖、乳糖的能力,可以初步判断该菌分解各类糖类的能力。新鲜培养 24 h 的菌液进行重悬混匀后,取 3 滴菌液加入装有各糖类的安瓿瓶中,并加入 1 滴丙三醇进行封液,用封口膜密封好后在 37 °C 保温箱厌氧静置培养 24 h 后,观察各生化管的颜色变化。生化反应管溶液蓝色为阴性,黄色为阳性(七叶苷溶液黄色或黑色均为阳性)。

1.2.3.4 动物双歧杆菌 B4 的耐胃酸性 对动物双歧杆菌 B4 株进行耐胃酸实验,配制人工胃液:100 ml 灭菌处理的 PBS 中加入 0.35 g 胃蛋白酶,用

0.1 mol/L 的 HCl 调整溶液 pH 为 2.5,然后经 0.22 μm 无菌滤过膜过滤除菌备用。将培养的菌液按 1% 的接种量加入人工胃液中(1 ml 菌液加入 99 ml 人工胃液),37 °C 保温箱厌氧静置培养 3 h,利用平板计数法分别测相同稀释梯度下 0、1、2、3 h 的活菌数。重复实验操作 3 次以上。

2 结果

2.1 16S rRNA 鉴定及系统发育树构建 通过革兰染色,在光镜下观察,细菌呈蓝紫色,有杆状、V 状、Y 状等多种形态,是典型的革兰阳性菌(图 1A)。在 MRS 琼脂上菌落大小不一,常呈光亮、圆滑、凸面的白色或乳白色(图 1B)。

动物双歧杆菌 16S rRNA 基因跑胶结果(图 1C)确定条带大小正确后,根据测序后拼接 16S rRNA 基因的完整序列,与 NCBI 官网数据库 BLAST 序列对比,并构建系统发育树进行物种鉴定(图 1D),在数据库中比对的最相似的菌种为 *Bifidobacterium animalis* subsp. Lactic strain YIT 4121 (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)。

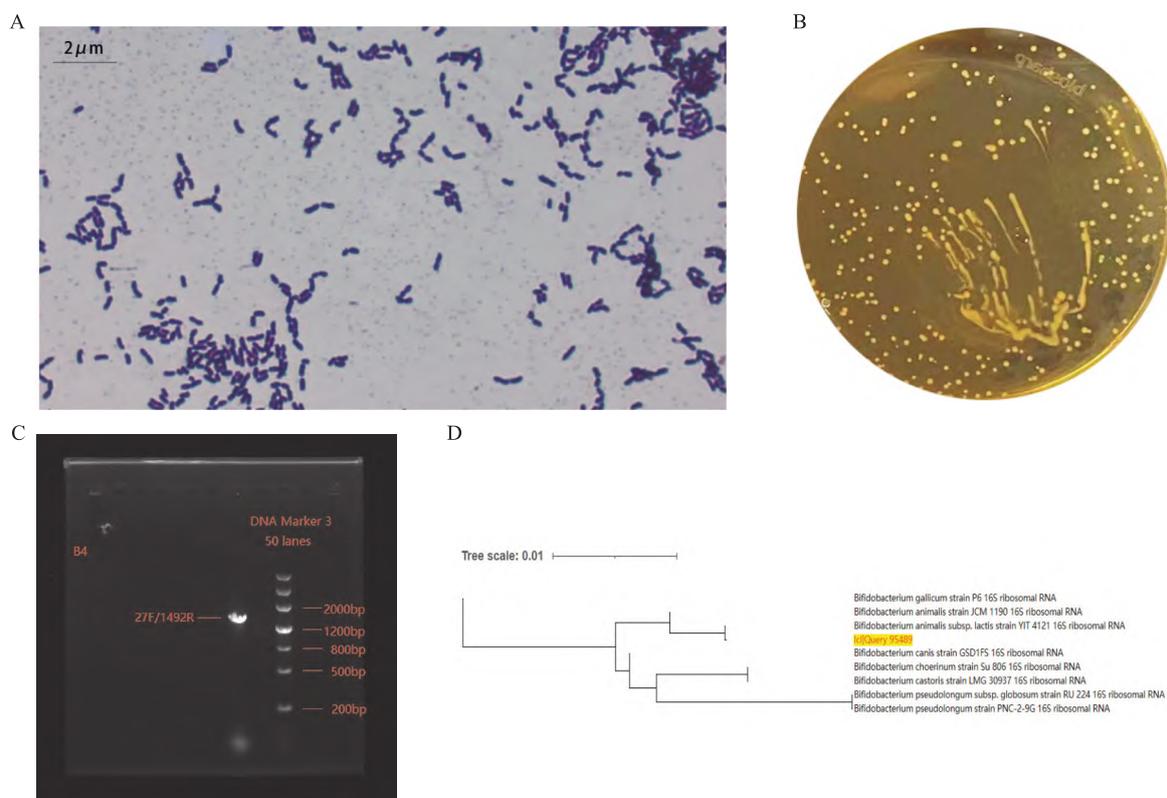


图 1 B4 菌的分离培养与鉴定

Fig. 1 Isolation, culture and identification of *Bifidobacterium animalis* B4

A: Gram staining of B4 $\times 100$; B: B4 grown in MRS medium; C: Agarose electrophoresis results with universal primers for B4; D: Phylogenetic tree constructed based on 16S rRNA gene.

2.2 动物双歧杆菌 B4 全基因组分析

2.2.1 测序与组装 经过二代和三代技术对动物双歧杆菌 B4 进行全基因组测序,绘制了 B4 的全基因组圈图(图 2)。动物双歧杆菌 B4 全基因组序列总碱基长度为 1 944 146 bp,GC 含量为 60.49%。预测到编码基因数目有 1 568 个,编码基因的总长度为 1 687 818 bp,占序列总碱基序列长度 86.82%。全部非编码 RNA 的数目为 74 个,rRNA 有 12 个,tRNA 有 52 个,其他非编码 RNA 有 10 个。重复序列中未观察到散在重复序列和串联重复序列。特殊结构的预测包括有 25 个分泌蛋白,2 条前噬菌体和 2 条 CRISPR 结构。

2.2.2 全基因组的功能注释

2.2.2.1 NR 数据库比对结果及全基因组系统发育树的构建 NR 数据库是一个非冗余的蛋白数据库,注释结果中会包含物种信息,可作物种分类用。注释到 NR 数据库的编码基因数目为 1 563 个,将注释到的物种进行统计,描绘出 NR 物种分布图(图 3A),结果显示该菌为动物双歧杆菌,相似度高达 97.44%。确定该菌为动物双歧杆菌后,根据全基因组测序结果,基于已经公开的动物双歧杆菌全基因组序列信息构建全基因组系统发育树(图 3B)及泛基因组分析(图 3C、表 1),从结果中可以看出动物

双歧杆菌 B4 与动物双歧杆菌 BB-12 的亲缘程度最高。

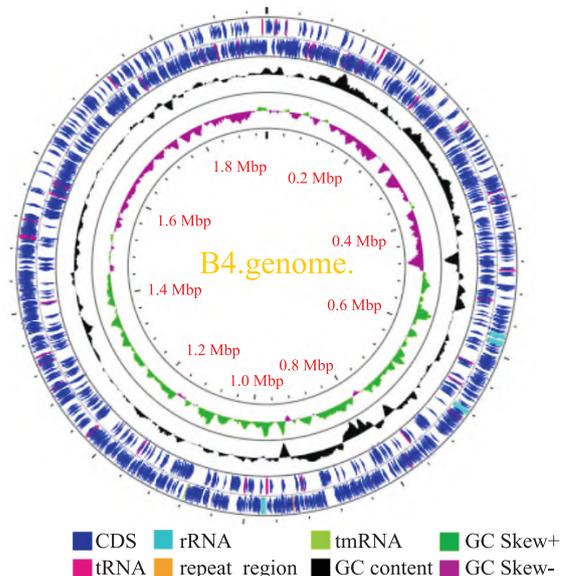
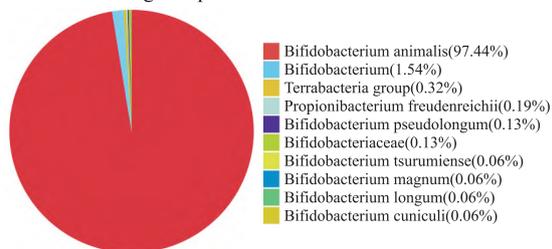


图 2 动物双歧杆菌 B4 株的基因组圈图

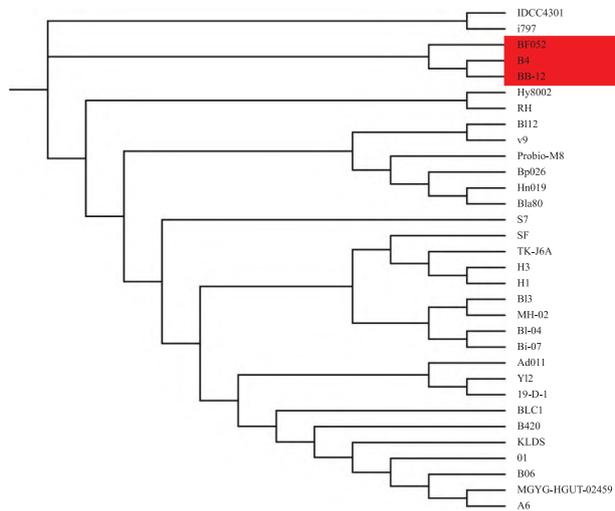
Fig.2 Circular genome maps of B4

B4; *Bifidobacterium animalis* B4; The four circles (outer to inner) showed the following: Circle 1 and 2 exhibited CDS on the forward and reverse strands, as well as rRNA, tRNA, and assembly gap; Circle 3 represented the GC content; Circle 4 showed the GC skew.

A NR Homologous species distribution



B



C

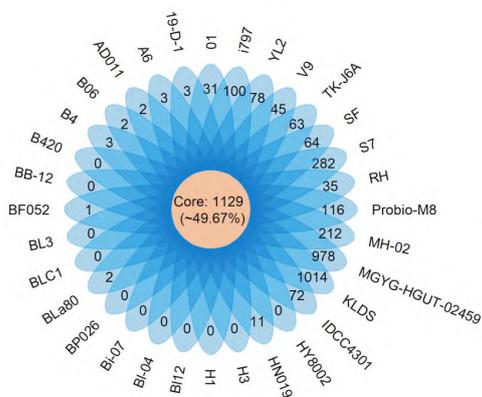


图 3 物种注释及泛基因组分析

Fig.3 The species annotation and pan-genome analysis

A: The species annotation of B4 against NR database; B: The phylogenetic tree established based on the core-genome of B4 and others *B. animalis*; C: Flower plot diagram showing the distributions of core genes, accessory genes, and unique genes across all strains.

表 1 B4 菌泛基因组分析信息表
Tab.1 The strains of *B. animalis* used for pan-genomic analysis

| Collection strain | Genome size (bp) | GC content (%) | No. of CDSs | No. of rRNA | No. of tRNAs | No. of tmRNA |
|------------------------------------|------------------|----------------|-------------|-------------|--------------|--------------|
| <i>B. animalis</i> 01 | 1 931 632 | 60.49 | 1 553 | 9 | 53 | 1 |
| <i>B. animalis</i> 19-D-1 | 1 963 057 | 60.64 | 1 587 | 12 | 53 | 1 |
| <i>B. animalis</i> A6 | 1 958 651 | 60.49 | 1 570 | 16 | 53 | 1 |
| <i>B. animalis</i> AD011 | 1 933 695 | 60.49 | 1 575 | 7 | 53 | 1 |
| <i>B. animalis</i> B4 | 1 944 146 | 60.49 | 1 559 | 12 | 53 | 1 |
| <i>B. animalis</i> B06 | 1 944 145 | 60.49 | 1 559 | 12 | 53 | 1 |
| <i>B. animalis</i> B420 | 1 944 145 | 60.48 | 1 559 | 12 | 53 | 1 |
| <i>B. animalis</i> BB-12 | 1 944 152 | 60.49 | 1 561 | 12 | 53 | 1 |
| <i>B. animalis</i> BF052 | 1 944 152 | 60.48 | 1 558 | 12 | 53 | 1 |
| <i>B. animalis</i> Bi-07 | 1 938 822 | 60.48 | 1 557 | 12 | 53 | 1 |
| <i>B. animalis</i> BL3 | 1 944 323 | 60.48 | 1 565 | 12 | 53 | 1 |
| <i>B. animalis</i> BI-04 | 1 938 709 | 60.48 | 1 559 | 12 | 53 | 1 |
| <i>B. animalis</i> BI12 | 1 938 606 | 60.48 | 1 560 | 12 | 53 | 1 |
| <i>B. animalis</i> BLa80 | 1 935 434 | 60.49 | 1 557 | 8 | 53 | 1 |
| <i>B. animalis</i> BLC1 | 1 938 583 | 60.49 | 1 557 | 12 | 53 | 1 |
| <i>B. animalis</i> BP026 | 1 935 214 | 60.49 | 1 560 | 9 | 53 | 1 |
| <i>B. animalis</i> H1 | 1 944 352 | 60.49 | 1 560 | 12 | 53 | 1 |
| <i>B. animalis</i> H3 | 1 944 351 | 60.49 | 1 560 | 12 | 53 | 1 |
| <i>B. animalis</i> HM019 | 1 935 423 | 60.49 | 1 560 | 9 | 53 | 1 |
| <i>B. animalis</i> HY8002 | 1 944 140 | 60.49 | 1 561 | 12 | 53 | 1 |
| <i>B. animalis</i> i797 | 1 943 538 | 60.49 | 1 564 | 12 | 53 | 1 |
| <i>B. animalis</i> IDCC4301 | 1 944 141 | 60.49 | 1 559 | 12 | 53 | 1 |
| <i>B. animalis</i> KLDS | 1 946 899 | 60.48 | 1 564 | 14 | 53 | 1 |
| <i>B. animalis</i> MGYG-HGUT-02459 | 1 958 651 | 60.49 | 1 570 | 16 | 53 | 1 |
| <i>B. animalis</i> MH-02 | 1 944 290 | 60.49 | 1 562 | 12 | 53 | 1 |
| <i>B. animalis</i> Probio-M8 | 1 937 197 | 60.49 | 1 559 | 9 | 53 | 1 |
| <i>B. animalis</i> RH | 1 931 057 | 60.48 | 1 562 | 7 | 53 | 1 |
| <i>B. animalis</i> S7 | 1 944 072 | 60.49 | 1 586 | 12 | 53 | 1 |
| <i>B. animalis</i> SF | 1 944 374 | 60.49 | 1 564 | 12 | 53 | 1 |
| <i>B. animalis</i> TK-J6A | 1 944 283 | 60.49 | 1 564 | 12 | 53 | 1 |
| <i>B. animalis</i> V9 | 1 944 050 | 60.49 | 1 559 | 12 | 53 | 1 |
| <i>B. animalis</i> YL2 | 2 027 369 | 60.21 | 1 531 | 12 | 53 | 1 |

2.2.2.2 KEGG 数据库注释 KEGG 数据库是系统分析基因功能、基因组信息的数据库,按照不同类型的生物过程进行绘制相应的生物通路图。注释到 KEGG 数据库的编码基因数目为 1 140 个,将生物代谢通路划分为 6 类,分别为:细胞过程、环境信息处理、遗传信息处理、人类疾病、新陈代谢、生物体系统,每一类又被系统分为二级分类,统计二级分类中各生物代谢通路上的基因数目绘制成图形(图 4)。在 KEGG 注释的分类中,注释到新陈代谢通路的基因最多(949 个),其中又以碳水化合物代谢(195 个)、全局总览图(192 个)和氨基酸代谢(169 个)为主要代表;然后是遗传信息处理(178 个),主要包括翻译(81 个)、复制与修复(69 个);剩下的还包括环境信息处理(95 个),细胞过程(87 个),人类疾病(51 个)和生物体系统(32 个)。在新陈代谢通路中有能量代谢(70 个)和聚糖的生物合成和代谢(37 个)有关基因,这与菌株的能量代谢和蛋白质聚糖

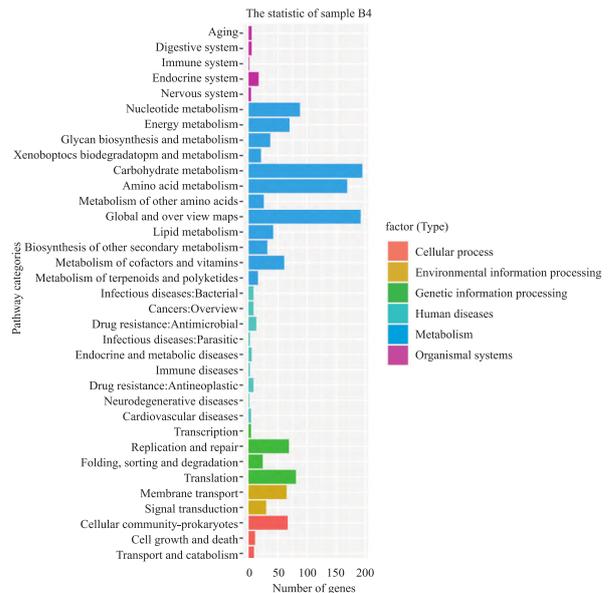


图 4 B4 菌的 KEGG 功能注释分布图
Fig.4 KEGG annotation of *B. animalis* B4

过程关系密切。

2.2.2.3 COG 数据库注释 通过 COG 数据库对比可以将某个蛋白序列注释到某一个 COG 中,每一簇 COG 由直系同源序列构成,从而推测该序列的功能并绘制分布图(图 5)。注释到 COG 数据库的编码基因数目为 1 243 个,注释到氨基酸运输和代谢(E)的基因有 162 个;在翻译、核糖体结构和生物合成(J)的基因数为 135 个,碳水化合物的运输和代谢(G)的基因有 133 个;剩下还包括复制、重组和修复(L,99 个),转录(K,91 个),细胞壁/膜/包膜生物合成(M,74 个),无机离子运输和代谢(P,65 个),核苷酸运输和代谢(F,61 个)等方面。

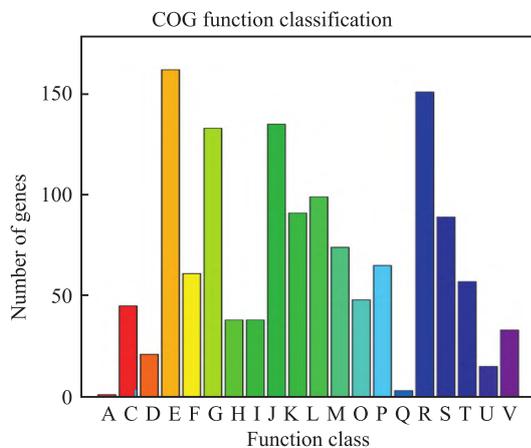


图 5 B4 菌的 COG 功能注释分布图

Fig.5 The histogram displaying the COG categories and the number of genes

A: RNA processing and modification; C: Energy production and conversion; D: Cell cycle control, cell division, chromosome partitioning; E: Amino acid transport and metabolism; F: Nucleotide transport and metabolism; G: Carbohydrate transport and metabolism; H: Coenzyme transport and metabolism; I: Lipid transport and metabolism; J: Translation, ribosomal structure and biogenesis; K: Transcription; L: Replication, recombination and repair; M: Cell wall/membrane/envelope biogenesis; O: Posttranslational modification, protein turnover, chaperones; P: Inorganic ion transport and metabolism; Q: Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism; R: General function prediction only; S: Function unknown; T: Signal transduction mechanisms; U: Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport; V: Defense mechanisms.

2.2.2.4 GO 数据库注释 通过 GO 数据库对基因和蛋白质功能进行限定和描述,结果包括基因产物的分子功能、生物途径、细胞组分这三个部分绘制成分布图(图 6)。注释到 GO 数据库的条目共有 3 053 个,其中生物学过程注释条目有 1 035 个,占总功能

注释的 33.90%,主要与代谢过程、细胞过程和定位等有关;在细胞组分分类中注释到 374 个基因,占总功能注释的 12.25%,主要与细胞组分等有关;在分子功能分类中注释到 1 644 个基因,占总功能注释的 53.85%,与催化活性、结合相关的注释最多。GO 数据库功能注释显示动物双歧杆菌 B4 在催化活动的分子功能方面的基因最丰富。

2.2.2.5 CAZy 数据库注释 CAZy 数据库将相关酶分类为糖苷水解酶、糖基转移酶、多糖裂合酶、糖脂酶及起辅助功能的酶等。动物双歧杆菌 B4 注释到 CAZy 数据库的基因共 195 个,其中包括 23 个 Carbohydrate-Binding 模块,9 个糖脂酶,68 个糖苷水解酶和 95 个糖基转移酶(图 7)。此结果显示动物双歧杆菌 B4 可以通过糖苷水解酶、糖基转移酶等途径起作用。在 CAZy 的注释结果中还可以得到有关 β -半乳糖苷酶、L-乳酸脱氢酶、乙醇脱氢酶等的基因,它们作为动物双歧杆菌 B4 重要的和极具特色的酶类,同时对食品生产和医药开发具有重要意义和潜在价值。见表 2。

表 2 CAZy 注释到 B4 菌的相关基因信息表

Tab.2 The table of CAZy's annotation to the *B. animalis* B4 related gene information

| Gene_ID | Start | End | CAZy_activities |
|---------|---------|---------|--|
| 1_155 | 178860 | 182318 | β -galactosidase (EC 3.2.1.23); β -mannosidase (EC 3.2.1.25); β -glucuronidase (EC 3.2.1.31); mannosylglycoprotein endo- β -mannosidase (EC 3.2.1.152); exo- β -glucosaminidase (EC 3.2.1.165) |
| 1_41 | 370904 | 371964 | ethanol dehydrogenase (EC 1.1.1.1) |
| 1_102 | 1049702 | 1060664 | L-lactic dehydrogenase (EC 1.1.1.27) |

2.2.2.6 CARD 数据库注释 CARD 数据库通过抗生素耐药性的本体得到的 SNP 信息,基于这些数据和模型,对 B4 进行抗生素抗性基因的预测。最终注释到 CARD 数据库的编码基因数目为 100 个,结果绘制成分布图(图 8)。其中含有抗生素排出泵的基因 50 个,占比 49.50%;含抗生素靶点改变的基因 32 个(31.68%),抗生素靶保护基因 14 个(13.86%),抗生素靶点替代基因 3 个(2.97%),抗生素失活基因 2 个(1.98%)。CARD 数据库注释结果显示动物双歧杆菌 B4 中最为主要的基因有 msbA、macB 和 TetA 等,它们分别与多重耐药、抗大环内酯类药物和抗四环素类药物相关。见表 3。

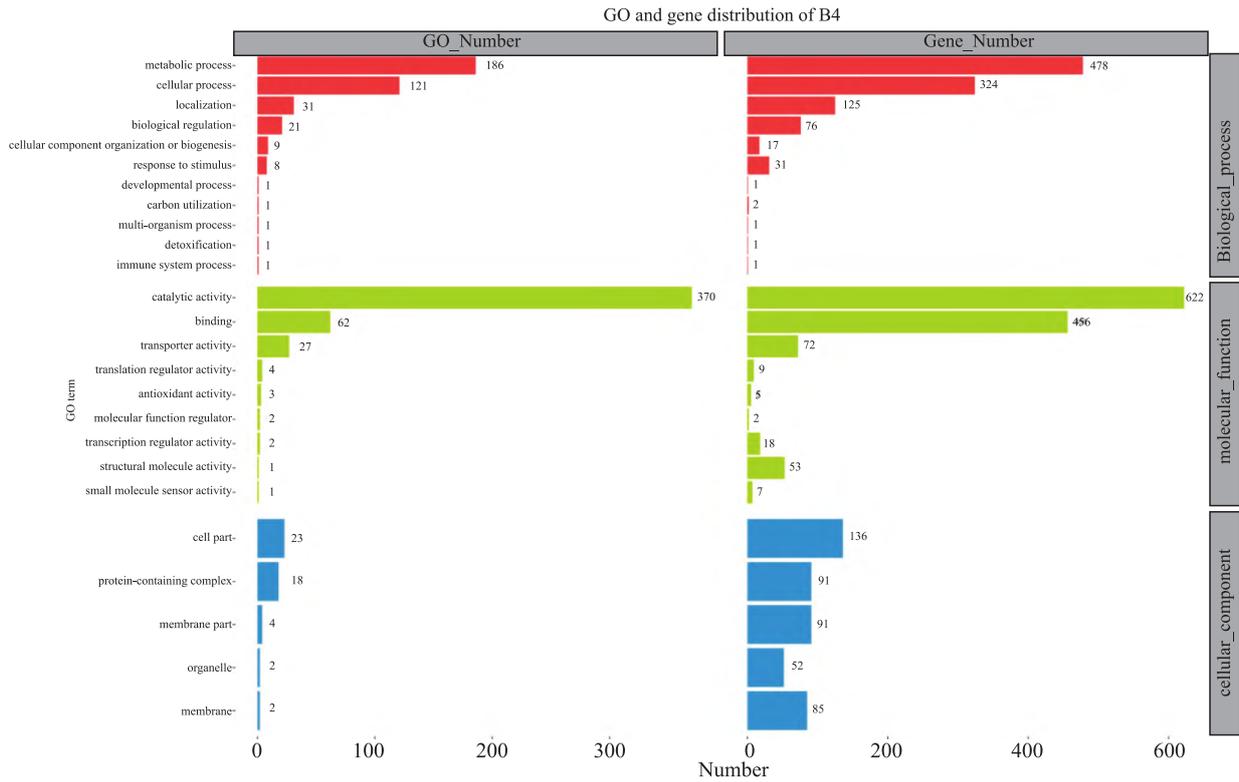


图6 B4 菌的 GO 功能注释分布图

Fig.6 The representation of GO annotation

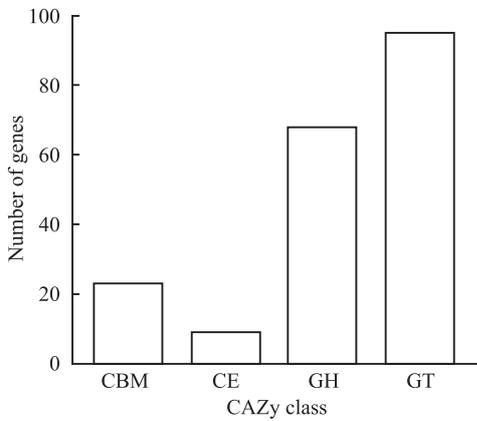


图7 B4 菌的 CAZy 数据库注释分布图

Fig.7 Bar plot showed the distribution of CAZy annotation categories

CBM: Carbohydrate-binding modules; CE: Carbohydrate esterases; GH: Glycoside hydrolases; GT: Glycosyl transferases.

2.2.3 毒力与致病性分析 在 VFDB 数据库注释分析显示动物双歧杆菌 B4 不含相应的毒力基因,说明动物双歧杆菌 B4 不会对机体产生致病性。同时全基因组结果显示其不含有质粒,故其所含有的耐药基因并不会因质粒的作用而转移,具有良好的益生菌的安全性。

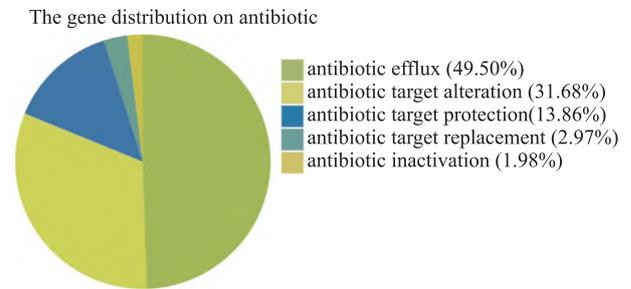


图8 B4 菌的 CARD 抗生素注释分布图

Fig.8 The CARD annotation of B4 strain

2.3 动物双歧杆菌体外实验结果

2.3.1 药敏试验 B4 菌的药敏试验结果及对各药物敏感程度用抑菌圈直径表示(图9),其中对诺氟沙星、万古霉素、苯唑西林、复方新诺明、链霉素、庆大霉素、阿米卡星、多粘菌素 B、卡那霉素等具有较强的耐药,这说明 B4 菌具有一定的耐药性。但在基因组分析中发现动物双歧杆菌 B4 无质粒,这说明其菌体内的耐药基因均在染色体上,并不会随着质粒的转移而出现耐药性转移的现象。综上所述,动物双歧杆菌 B4 的耐药基因少且传播能力不高。

2.3.2 溶血实验和生化反应管试验 通过将动物

表3 CARD 数据库注释到 B4 菌相关基因信息表

Tab.3 The table of CARD database's annotation to the B4 bacterium related gene information

| Gene_ID | Start | End | CARD_ID | CARD_Drug_class | CARD_Description |
|---------|--------|--------|-----------------------------------|---------------------------|--|
| 1_81 | 79881 | 80660 | gb NP_415434.1 ARO:3003950 msbA | nitroimidazole antibiotic | MsbA is a multidrug resistance transporter homolog from E. coli and belongs to a superfamily of transporters that contain an adenosine triphosphate (ATP) binding cassette (ABC) which is also called a nucleotide-binding domain (NBD). MsbA is a member of the MDR-ABC transporter group by sequence homology. MsbA transports lipid A, a major component of the bacterial outer cell membrane, and is the only bacterial ABC transporter that is essential for cell viability |
| 1_128 | 146813 | 147790 | gb AAV85982.1 ARO:3000535 macB | macrolide antibiotic | MacB is an ATP-binding cassette (ABC) transporter that exports macrolides with 14- or 15- membered lactones. It forms an antibiotic efflux complex with MacA and TolC. macB corresponds to 1 locus in Pseudomonas aeruginosa PAO1 and 1 locus in Pseudomonas aeruginosa LESB58 |
| 1_744 | 969713 | 971716 | gb AAA20117.1 ARO:3000195 tetB(P) | tetracycline antibiotic | TetB (P) is a tetracycline ribosomal protection protein found on the same operon as tetA (P), a tetracycline efflux protein |

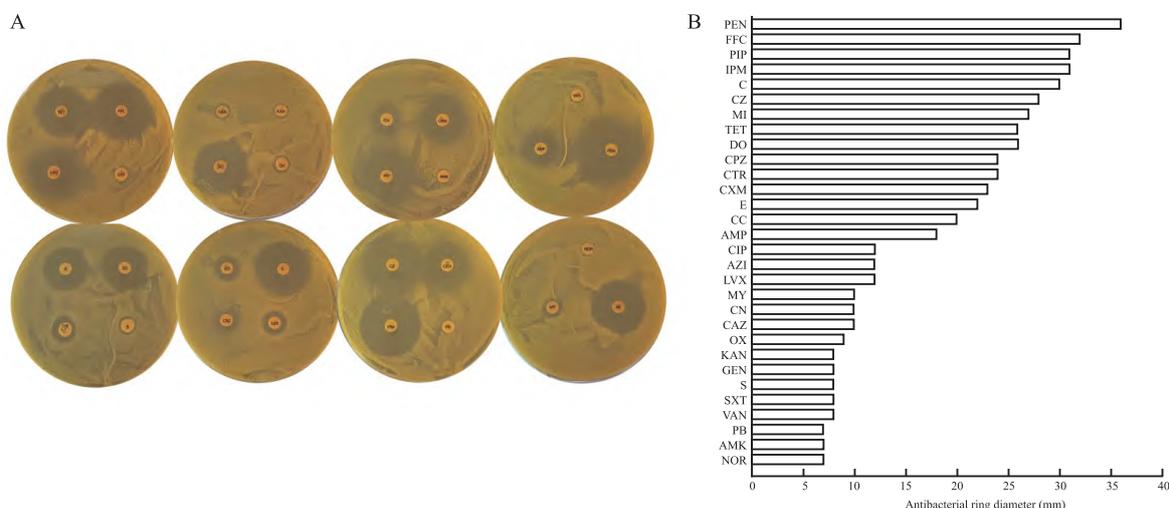


图9 药敏实验

Fig.9 Drug sensitivity

A: Drug sensitivity test of B4 (Drug sensitive paper diameter = 6 mm); B: Statistical graph of diameter of inhibitory zone produced by B4 against various antibiotics.

双歧杆菌 B4 菌液涂布在哥伦比亚血琼脂平板上, 24 h 培养后可以长出圆润完整的菌落(图 10A)。同时在菌落周围并未见明显的透明溶血圈, 这说明动物双歧杆菌 B4 无溶血性。B4 菌的生化反应管实验结果显示(图 10B), 除七叶苷外所有生化反应管均由蓝色变为黄色, 这说明动物双歧杆菌 B4 菌对纤维二糖、麦芽糖、甘露醇、水杨苷、山梨醇、蔗糖、棉子糖、菊糖、乳糖均产生较好的分解能力, 而在七叶苷反应管的实验中结果由蓝色变为黑色, 结果也属于阳性。符合动物双歧杆菌生化反应的研究结果。

2.3.3 耐胃酸实验 通常胃酸的 pH 值在 2.0 ~ 3.0 之间, 耐胃酸是益生菌经过胃到达肠道的第一步, 因此作为益生菌来说耐胃酸是一个重要的特性。

动物双歧杆菌 B4 的模拟人胃液实验(图 11)显示在耐胃酸 0、1、2、3 h 后采用稀释涂布平板法, 在 1×10^{-4} 稀释梯度中多次重复取平均值分别为 247、224、198、188 个菌落, 随着时间的增加, 模拟胃液中活菌数有少量减少; 经过胃酸 3 h 处理后的动物双歧杆菌 B4 的活菌存活率取平均数后为 76.11%, 说明其具有良好的耐胃酸性, 满足益生菌的特性。

3 讨论

本研究从健康人粪便中分离一株动物双歧杆菌 B4 株, 经全基因组鉴定该菌与动物双歧杆菌相似度高达 97.44%, 确定为 *Bifidobacterium animalis* subsp. lactis。基于全基因组系统发育树的建立和泛基因



图 10 溶血和生化反应实验

Fig. 10 Hemolysis and biochemical reaction experiments

A: Hemolytic test of B4 in blood agar; B: Biochemical test of B4 in various fermentation tubes.

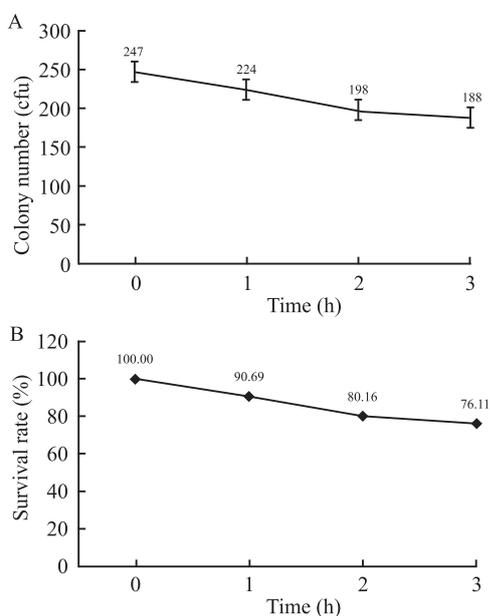


图 11 B4 菌耐胃酸实验

Fig. 11 Resistance to stomach acid test

A: Curves of the number of bacteria surviving after 0, 1, 2 and 3 hours in the stomach acid resistance test of B4; B: Bacterial survival rate curve of B4 after 1, 2 and 3 hours of stomach acid resistance test.

组分析, B4 菌与动物双歧杆菌 BB-12 的亲缘程度最高, 并与其他多种已经发现的具有益生作用的动物双歧杆菌有一定的亲缘关系, 这表明 B4 菌很可能具有益生潜力。

使用三代测序技术进行全基因组测序, 动物双歧杆菌 B4 全基因组长度为 1 944 146 bp, GC 含量为 60.49%。重复序列中未观察到散在重复序列和串联重复序列, 对于基因组内部重复序列也仅收集到 24 个, 特殊结构的预测显示其包含 2 个前噬菌体

和 2 条 CRISPR 结构, 研究^[21]表明一些简单的重复序列与某些疾病有关, 而 B4 菌的这种低冗余性反映其安全无毒的特性, 但对外的抵抗作用可能存在不足。各数据库注释结果显示 B4 菌在新陈代谢通路的基因最多, 其中包括能量代谢和聚糖的生物合成和代谢有关基因, 这表明该菌具有强大的能量代谢能力, 可以适应环境变化。B4 菌还有与氨基酸运输和代谢、碳水化合物的运输和代谢等相关的基因, 在参与维生素 B6 代谢、糖代谢、次生胆汁酸生物合成、组氨酸代谢、脂肪细胞因子信号通路、胰岛素信号通路、阿卡波糖和缬霉素的生物合成、脂肪酸代谢、胰高血糖素信号通路、半乳糖代谢、胰岛素抵抗、PPAR 信号通路等方面具有重要作用, 这在治疗糖尿病、肥胖症、脂肪肝等疾病中可能存在较大的潜力。B4 菌的基因主要富集在生物学过程和分子功能分类这两个注释条目, 说明其在代谢过程、细胞过程和与催化活性、结合相关过程中具有良好的能力。除此之外结果中还提到了 B4 菌基因中包括 β -半乳糖苷酶、L-乳酸脱氢酶、乙醇脱氢酶等, 它们对食品生产和医药开发具有重要意义和潜在价值。

优良的益生菌在拥有益生作用潜力的同时, 还要有适合临床应用的安全性。在 B4 菌抗生素抗性基因中, 含有抗生素排出泵的基因数最多, 其次为抗生素靶点改变的基因, 抗生素靶保护基因, 抗生素靶点替代基因, 抗生素失活基因。其中最为主要的基因有 *msbA*、*macB* 和 *TetA* 等, 它们分别与多重耐药、抗大环内酯类药物和抗四环素类药物相关。同时, 动物双歧杆菌 B4 不含有致病细菌、衣原体和支原体致病因子, 也不含相应的毒力基因, 安全性很高。

除此之外,本研究对动物双歧杆菌 B4 株分别进行了药敏试验、溶血实验、生化反应试验和耐胃酸实验。B4 菌虽然对万古霉素、阿米卡星、卡那霉素等具有很强的耐药,但该菌无质粒,这说明其菌体内的耐药基因仅在染色体上,并不会随着质粒的转移而出现耐药性转移的现象,所以对宿主来说是安全可靠的。B4 菌的溶血实验结果显示菌落周围并未见明显的透明溶血圈,这说明动物双歧杆菌 B4 不含有溶血素,对人体是安全的。B4 菌对纤维二糖、麦芽糖、甘露醇、山梨醇、蔗糖、菊糖、乳糖等均具有较好的分解能力,这与 B4 菌具有丰富的糖苷水解酶有关,这一特点为动物双歧杆菌 B4 株日后在治疗人的乳糖不耐受症、糖尿病、肥胖症等疾病提供新思路。耐胃酸是动物双歧杆菌通过胃到达十二指肠和小肠上段定殖的必要条件。动物双歧杆菌 B4 的模拟人胃液实验结果显示在耐胃酸 3 h 后 B4 的活菌存活率达到 76.11%,说明其具有良好的耐胃酸性,为后续定殖到肠道中作用提供必要的条件。

综上所述,从健康人粪便中获得的动物双歧杆菌 B4 经全基因组分析显示具有多种益生基因,体外实验显示具有优良的益生特性。B4 菌具有多种糖苷分解能力和无耐药、无溶血、耐胃酸的特性,有望在临床上为乳糖不耐受症的患者提供解决策略,也为日后该类菌株的研究和应用提供理论基础。

参考文献

- [1] Suez J, Zmora N, Segal E, et al. The pros, cons, and many unknowns of probiotics [J]. *Nat Med*, 2019, 25(5): 716 - 29. doi:10.1038/s41591-019-0439-x.
- [2] Williams N T. Probiotics [J]. *Am J Bot*, 2010, 67(6): 449 - 58. doi: 10.2146/ajhp090168.
- [3] Hidalgo-Cantabrana C, Delgado S, Ruiz L, et al. Bifidobacteria and their health-promoting effects[J]. *Microbiol Spectr*, 2017, 5(3): 1 - 19. doi:10.1128/microbiolspec.BAD-0010-2016.
- [4] 杨夕缘. 动物双歧杆菌乳亚种干预便秘的作用途径研究[D]. 无锡: 江南大学, 2023. doi:10.27169/d.cnki.gwqgu.2023.001374.
- [4] Yang X Y. Research on the Action Paths of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* in Intervening in Constipation [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2023. doi:10.27169/d.cnki.gwqgu.2023.001374.
- [5] 吴姚平. 肠道微生物对肠道屏障影响的初步探究[D]. 南昌: 南昌大学, 2017.
- [5] Wu Y P. Preliminary study on the influence of intestinal microorganisms on intestinal barrier[D]. Nanchang: Nanchang University, 2017.
- [6] Jungersen M, Wind A, Johansen E, et al. The Science behind the Probiotic Strain *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12[J]. *Microorganisms*, 2014, 2(2): 92 - 110. doi:10.3390/microorganisms2020092.
- [7] Milani C, Duranti S, Lugli G A, et al. Comparative genomics of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* reveals a strict monophyletic bifidobacterial taxon [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2013, 79(14): 4304 - 15. doi:10.1128/AEM.00984-13.
- [8] Balaguer F, Enrique M, Llopis S, et al. Lipoteichoic acid from *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BPL1: a novel postbiotic that reduces fat deposition via IGF-1 pathway[J]. *Microb Biotechnol*, 2022, 15(3): 805 - 16. doi: 10.1111/1751-7915.13769.
- [9] Wang C H, Yen H R, Lu W L, et al. Adjuvant probiotics of *Lactobacillus salivarius* subsp. *salicinius* AP-32, *L. johnsonii* MH-68, and *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* CP-9 attenuate glycaemic levels and inflammatory cytokines in patients with type 1 diabetes mellitus [J]. *Front Endocrinol*, 2022, 13: 754401. doi: 10.3389/fendo.2022.754401.
- [10] Tonucci L B, Olbrich Dos Santos K M, Licursi De Oliveira L, et al. Clinical application of probiotics in type 2 diabetes mellitus: a randomized, double-blind, placebo-controlled study[J]. *Clin Nutr*, 2017, 36(1): 85 - 92. doi:10.1016/j.clnu.2015.11.011.
- [11] Cheng J, Laitila A, Ouwehand A C. *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* HN019 effects on gut health: a review [J]. *Front Nutr*, 2021, 8: 790561. doi:10.3389/fnut.2021.790561.
- [12] Mc Carthy A. Third generation DNA sequencing: pacific biosciences' single molecule real time technology [J]. *Chem Biol*, 2010, 17(7): 675 - 6. doi:10.1016/j.chembiol.2010.07.004.
- [13] Rhoads A, Au K F. PacBio sequencing and its applications [J]. *Genomics Proteomics Bioinformatics*, 2015, 13(5): 278 - 89. doi:10.1016/j.gpb.2015.08.002.
- [14] Nurk S, Walenz B P, Rhie A, et al. HiCanu: accurate assembly of segmental duplications, satellites, and allelic variants from high-fidelity long reads [J]. *Genome Res*, 2020, 30(9): 1291 - 305. doi:10.1101/gr.263566.120.
- [15] Cheng H, Concepcion G T, Feng X, et al. Haplotype-resolved de novo assembly using phased assembly graphs with hifiasm [J]. *Nat Methods*, 2021, 18(2): 170 - 5. doi:10.1038/s41592-020-01056-5.
- [16] Andrews J M, Howe R A. BSAC standardized disc susceptibility testing method (version 10) [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2011, 66(12): 2726 - 57. doi:10.1093/jac/dkr359.
- [17] Chen S, Zhou Y, Chen Y, et al. Fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor [J]. *Bioinformatics*, 2018, 34(17): i884 - i890. doi:10.1093/bioinformatics/bty560.
- [18] Walker B J, Abeel T, Shea T, et al. Pilon: an integrated tool for comprehensive microbial variant detection and genome assembly improvement [J]. *PLoS One*, 2014, 9(11): e112963. doi:10.

- 1371/journal.pone.0112963.
- [19] Hyatt D, Chen G L, Locascio P F, et al. Prodigal: prokaryotic gene recognition and translation initiation site identification [J]. *BMC Bioinformatics*, 2010, 11: 119. doi:10.1186/1471-2105-11-119.
- [20] 钟伟萍. 纸片扩散法抗菌药物敏感试验的质量控制[J]. *中国卫生产业*, 2017, 14(26): 38-9. doi:10.16659/j.cnki.1672-5654.2017.26.038.
- [21] Zhong W P. Quality control of anti-bacterial drug sensitive test of paper diffusion method [J]. *China Health Ind*, 2017, 14(26): 38-9. doi:10.16659/j.cnki.1672-5654.2017.26.038.
- [22] Alseth E O, Pursey E, Luján A M, et al. Bacterial biodiversity drives the evolution of CRISPR-based phage resistance [J]. *Nature*, 2019, 574(7779): 549-52. doi:10.1038/s41586-019-1662-9.

Whole genome sequencing of *Bifidobacterium animalis* subsp. lactic B4 and analysis of its probiotic properties

Ding Ruipei¹, Liu Chengzhong², Shi Cancan², Zhang Huiyu¹, Dai Yiping², Mu Ruxue², Li Zilong², He Maozhang², Li Zhuojun³

(¹The First Clinical School of Medicine, ²Dept of Microbiology, Anhui Medical University, Hefei 230032; ³Dept of Basic Medicine, Fuzhou Medical College of Nanchang University, Fuzhou 344000)

Abstract Objective To investigate whole genome information of a newly isolated *Bifidobacterium animalis* subsp. lactic B4 strain from healthy human feces was analyzed and its probiotic properties. **Methods** The antimicrobial resistance, hemolytic, gastric acid tolerance and biochemical characteristics of *B. animalis* B4 were evaluated by *in vitro* experiments, and its whole genome was sequentially sequenced and functional annotation was performed by next and three-generation sequencing technology. **Results** Whole genome sequencing of *B. animalis* B4 showed that its genome size was 1 944 146 bp, with GC content of 60.49%, no plasmid, and a total of 1 642 genes. The results of *in vitro* analysis showed that the *B. animalis* B4 had good probiotic properties, including non-hemolytic and stomach acid resistance. At the same time, the genome results showed that the *B. animalis* B4 strain did not have toxin and disease-related genes, drug resistance genes were few and the transmission ability was not high, so it had high safety. Gene annotation of KEGG, COG and GO showed that it contained many biological active enzymes, such as β -galactosidase, L-lactate dehydrogenase and other probiotic genes. **Conclusion** The *B. animalis* B4 has good probiotic properties, showing excellent safety at the genetic level, with a probiotic gene sequence.

Key words *Bifidobacterium animalis*; isolation and culture; whole genome sequencing; genome analysis; probiotics; probiotic gene

Fund programs National Natural Science Foundation of China (No. 82302568); Jiangxi Provincial Department of Education Science and Technology Research Project Item—General Item (No. GJJ2203414); Natural Science Foundation of Anhui Province (No. 2308085QH283); Young Core Teachers Domestic Visiting Project from Education Department of Anhui Province (No. gxjnf2023003); College Student Innovation and Entrepreneurship Training Project in Anhui Medical University (No. 202310366054)

Corresponding authors He Maozhang, E-mail: hzm91@ahmu.edu.cn; Li Zhuojun, E-mail: 247732391@qq.com