

## 应用 rep-PCR 分型技术筛选潜在治疗性乳杆菌

王江<sup>1</sup>, 张瑞芬<sup>2</sup>, 周莉<sup>3</sup>, 苏小虎<sup>3</sup>, 胡春红<sup>4</sup>, 王萌<sup>5</sup>, 向阳<sup>6</sup>, 杨毅<sup>6</sup>, 朱宝利<sup>2</sup>, 冯涛<sup>1</sup>

- 1 重庆医科大学基础医学院 生物化学与分子生物学教研室, 重庆 400016
- 2 中国科学院微生物研究所, 北京 100101
- 3 惠斯康健康科技(北京)有限公司, 北京 100086
- 4 中国科学院大气物理研究所医务室, 北京 100029
- 5 卫生部北京医院检验科生化室, 北京 100730
- 6 北京协和医院妇产科, 北京 100005

**摘要:** 分离鉴定阴道弯曲乳酸杆菌并对其基因分型分析和产 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 能力测定, 初步筛选具有潜在防治女性生殖道感染的弯曲乳酸杆菌菌株。将健康妇女阴道分泌物接种到 de Man, Rogosa and Sharpe (MRS) 培养基, 分离培养乳酸杆菌。通过 16S rRNA 序列进行乳酸杆菌分类鉴定, 重复序列片段 PCR 扩增方法进行弯曲乳酸杆菌的基因分型, 并进一步采用 pH 直接测酸法和辣根过氧化物酶催化四甲基联苯胺与过氧化氢反应显色法检测了 10 株弯曲乳酸杆菌产酸和产 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 能力。经过序列比对鉴定, 共得到 65 株乳酸杆菌。其中, 弯曲乳杆菌 *Lactobacillus crispatus* 19 株, 詹氏乳杆菌 *Lactobacillus jensenii* 17 株, 发酵乳杆菌 *Lactobacillus fermentum* 12 株; rep-PCR 分型发现不同种类的乳酸杆菌和同一种弯曲乳酸杆菌均表现为不同的带型指纹图; 10 株弯曲乳酸杆菌均产酸, 其中 T22-3 和 T29-5 两株弯曲乳酸杆菌产 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 量最高。结果表明个体阴道内乳酸杆菌分布具有差异, 弯曲乳酸杆菌具有种内多样性, 产 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 丰富的 T22-3 和 T29-5 两株弯曲乳酸杆菌有可能作为防治女性生殖道感染的有益菌株。

**关键词:** 弯曲乳杆菌, 基因分型, 阴道菌群, 过氧化氢

## Selection and genotyping of lactobacillus with potential preventive effect by repetitive element sequence-based PCR analysis

Jiang Wang<sup>1</sup>, Ruifen Zhang<sup>2</sup>, Li Zhou<sup>3</sup>, Xiaohu Su<sup>3</sup>, Chunhong Hu<sup>4</sup>, Meng Wang<sup>5</sup>, Yang Xiang<sup>6</sup>, Yi Yang<sup>6</sup>, Baoli Zhu<sup>2</sup>, and Tao Feng<sup>1</sup>

- 1 Department of Biochemistry and Molecular Biology, College of Basic Medicine, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China
- 2 Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China
- 3 Healskare Health Technology Co., Ltd, Beijing 100086, China

**Received:** December 15, 2010; **Accepted:** April 18, 2011

**Supported by:** National Natural Science Foundation of China (No. 30770060), Open Foundation of National Key Laboratory for Diagnosis and Treatment of Infectious Disease, the First Affiliated Hospital, College of Medicine, Zhejiang University (No. 2009KF12).

**Corresponding author:** Tao Feng. Tel: +86-23-68485627; E-mail: fengtao9\_9@yahoo.com

国家自然科学基金 (No. 30770060), 浙江大学医学院第一附属医院传染病诊治国家重点实验室开放基金 (No. 2009KF12) 资助。

4 Institute of Atmospheric Physics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100029, China

5 Department of Clinical Laboratory, Beijing Hospital of Ministry of Health, Beijing 100730, China

6 Department of Gynecology and Obstetrics, Peking Union Medical College Hospital, Beijing 100730, China

**Abstract:** We selected and characterized isolates of *Lactobacillus crispatus* (*L. crispatus*) for potential preventing infections of the female reproductive tract. We cultured vaginal swabs from healthy volunteers on de Man, Rogosa and Sharpe (MRS) agar and identified the isolates at the species level by 16S rRNA sequence and genotyped the isolates of *Lactobacillus* by PCR amplification of repetitive bacterial DNA elements (rep-PCR). Furthermore, 10 *L. crispatus* strains were assessed for hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) and acid production. Overall 65 isolates were confirmed to be *Lactobacillus* by sequence analogy, among them 19 were *L. crispatus*, 17 were *Lactobacillus jensenii* and 12 were *Lactobacillus fermentum*. rep-PCR produced specie and strain-specific genomic fingerprints for the *Lactobacillus* isolates. The selected 10 *L. crispatus* isolates produced highly acidic environment after growth in MRS. The isolates T22-3 and T29-5 demonstrated high production of  $H_2O_2$ . This study indicated that there are individual differences with vaginal *Lactobacillus* colonization, and strain diversity within vaginal *L. crispatus* isolates, T22-3 and T29-5 might be candidates for restoring urogenital health environment in females.

**Keywords:** *Lactobacillus crispatus*, genotyping, vaginal flora,  $H_2O_2$

阴道细菌种类的变化与妇女和胎儿的健康密切相关, 阴道的有益菌和条件致病菌在种类和数量上基本恒定, 共同维持阴道微生态平衡<sup>[1]</sup>。其中, 乳酸杆菌是维持阴道正常微生态环境最常见和最重要的有益菌<sup>[2]</sup>, 在阴道微生态环境中占到 95%, 而主要的乳酸杆菌占到 50%~80%<sup>[3-4]</sup>, 它分解阴道粘膜上皮细胞内的糖原产生乳酸和过氧化氢, 使阴道保持酸性环境 (pH 值为 3.8~4.2), 阴道的酸性环境和过氧化氢对抑制条件致病菌的侵入和生长具有重要的防御作用<sup>[3]</sup>。

细菌性阴道病是育龄期妇女最为常见但又未受重视的多细菌感染性疾病, 以明显的阴道微生态环境紊乱, 乳酸杆菌优势地位被大量厌氧菌群替代为主要特征<sup>[5]</sup>。细菌性阴道病是“小疾病, 大麻烦”, 患者感染艾滋病和淋病的危险性明显增加; 妊娠妇女易出现妊娠并发症, 如早产及绒毛膜羊膜炎等。由于抗生素治疗细菌性阴道病效果欠佳, 复发率高达 50% 以上<sup>[6]</sup>, 因此, 调节乳酸杆菌制剂的研究日益引起人们的重视, 国内外一直在努力研制试图开发一种乳酸杆菌生态制剂, 在利用抗生素清除致病菌后, 直接补充阴道内正常生理细菌, 调节阴道内菌群平衡。

目前, 我国已有乳酸杆菌制剂产品定菌生用于细菌性阴道病的治疗<sup>[7]</sup>, 并已经取得了一定的疗效,

但尚未达到人们预期的效果, 这可能与其主要成分德氏乳杆菌并非我国妇女阴道菌群中的优势菌群有关。近来研究提示: 我国健康育龄期妇女阴道菌群的结构相对简单, 以弯曲乳酸杆菌或惰性乳杆菌占优势<sup>[8-9]</sup>。不同的弯曲乳酸杆菌分离株可能存在基因型的差异, 本研究旨在分离鉴定阴道弯曲乳酸杆菌并通过对其基因分型和产  $H_2O_2$  的初步研究, 筛选具有防治女性生殖道感染的弯曲乳酸杆菌菌株。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂和仪器

细菌基因组 DNA 提取试剂盒购自天根生化科技有限公司, MRS 培养基购自美国 OXID 公司, *Taq* 酶购自 TaKaRa 公司, 引物由上海生工生物工程有限公司合成, PCR 扩增仪购自美国 Applied Biosystems 公司; 电泳仪购自美国 BIO-RAD 公司, 凝胶成像仪购自美国 Alpha Innotech 公司, 培养箱购自上海博远, 酶标仪购自美国 BIO-TEK, pH 计购自意大利 HANNA 等。

### 1.2 菌株

95 例健康志愿者阴道分泌物, 由卫生部北京医院检验科提供。样本依次编号为 T1、T2、T3……T95, 接种于 MRS 培养基, 37 °C 厌氧培养 24 h<sup>[10]</sup>。每个样本随机挑选 5 个单菌落于 2 mL MRS 培养基

中培养增菌 24 h, 菌落依次编号 T1-1、T1-2、T1-3、T1-4 和 T1-5, 其余类推。扩增细菌用于细菌保种与 DNA 制备。

### 1.3 rep-PCR 基因分型筛选

为了避免对所有菌株进行测序, 我们首先利用 rep-PCR 方法对分离所得菌株进行基因分型。扩增引物 REP1R-Dt (3'-CGGNCTACNGCNGCNIII-5') 和 REP2-Dt (3'-CATCCGGNCTATCNGCN-5')<sup>[11]</sup>。25  $\mu$ L 反应体系: 1 $\times$ buffer, 10% 二甲基亚砜, 上游及下游引物各 50 pmol, dNTPs 各 1.2 mmol/L, MgCl<sub>2</sub> 7 mmol/L, 2.5 U *Taq* 酶, 100 ng DNA 模板。反应条件: 94  $^{\circ}$ C 预变性 7 min; 90  $^{\circ}$ C 变性 30 s, 40  $^{\circ}$ C 退火 1 min, 65  $^{\circ}$ C 延伸 8 min, 共 32 个循环; 65  $^{\circ}$ C 延伸 16 min<sup>[12]</sup>。PCR 产物用 1% 凝胶电泳进行检测, 成像、比较 DNA 带型。选择具有不同带型的菌株做下一步的 16S rRNA 基因序列分析。

### 1.4 乳酸杆菌的鉴定

采用 27F-1492R 通用引物扩增细菌 16S rRNA 基因保守区。25  $\mu$ L 扩增体系包括: 1 $\times$ PCR 反应缓冲液, 200  $\mu$ mol/L dNTPs, 上游及下游引物各 0.2  $\mu$ mol/L, 1 U *Taq* DNA 聚合酶, 1  $\mu$ L 乳杆菌基因组 DNA。反应条件: 94  $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94  $^{\circ}$ C 变性 30 s, 55  $^{\circ}$ C 退火 40 s, 72  $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 共 25 个循环; 72  $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 产物用 1% 凝胶电泳检测, 阳性结果送北京诺赛公司, 用 27F-1492R 进行双向测序。将测序结果拼接后选取中间的 1 400 bp 与 NCBI 数据库比对, 与参考序列一致性大于 97% 则将其归为该类乳杆菌。

### 1.5 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 检测

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 标准曲线制作: 首先用 100 mmol/L 哌嗪-N,N'-二-乙磺酸 (Piperazine-N,N'-Bis 2-ethanesulfonic acid, PIPES) 将 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (相当于 9.128 mol/L) 储存液稀释成 1 mol/L, 再用 100 mmol/L PIPES 将 1 mol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 分别稀释成 0、20、40、60、80、100  $\mu$ mol/L 工作液; 然后分别取 100  $\mu$ L 上述 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 工作液与 100  $\mu$ L 20 mmol/L TMB (四甲基联苯胺)、2  $\mu$ L 辣根过氧化物酶 (1 mg/mL) 混合, 16  $^{\circ}$ C 孵育

10 min, 测量 OD<sub>630</sub> 值。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 浓度标准曲线:  $y=0.0033x-0.0496$ ,  $R^2=0.992$ 。乳杆菌液体培养 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 浓度检测: 挑取乳杆菌单菌落, 接种 1 mL 培养 48 h 的菌液于 10 mL MRS 液体培养基中, 37  $^{\circ}$ C 静置培养 21 h 后, 转换为振荡培养 3 h, 振速为 220 r/min, 然后 12 000 r/min 离心 2 min, 取 100  $\mu$ L 菌液上清检测 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 根据标准曲线, 计算 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 浓度<sup>[13]</sup>。

### 1.6 pH 检测

将活化的乳酸杆菌以 5% 比例接种 MRS 培养基 (pH 6.3) 中, 37  $^{\circ}$ C 培养。用 TECAN infinite M200 酶标仪与意大利 HANNA 精密酸度计每隔 12 h 测其 OD<sub>630</sub> 与 pH 值, 以 H<sup>+</sup> 浓度与 OD<sub>630</sub> 比值计算单位菌体密度产酸量。

## 2 结果与分析

### 2.1 菌株鉴定

实验收集了 95 例样品, 其中 6 例培养失败, 剩余 89 例样品经过 MRS 平板培养, 挑取 445 个单克隆进行 MRS 液体培养及 DNA 提取; 随后 rep-PCR 基因分型筛选得到 85 个具有不同带型的菌株; 再进一步通过 16S rRNA 测序比对, 最后确认 65 株乳酸杆菌。表 1 为测序分析结果, 其中, *L. crispatus* 19 株, *L. jensenii* 17 株, *L. fermentum* 12 株, 主要菌株与文献报道相符<sup>[14]</sup>。

### 2.2 rep-PCR 基因分型带型图谱比较

人体阴道环境的乳酸杆菌的分布具有复杂性和多样性, T49 号阴道环境中乳酸杆菌种类单一, 如

表 1 65 株乳酸杆菌分布情况

Table 1 Distribution of 65 *Lactobacillus* isolates

Species	Number	Species	Number
<i>L. crispatus</i>	19	<i>L. fermentum</i>	12
<i>L. jensenii</i>	17	<i>L. gasseri</i>	5
<i>L. acidophilus</i>	4	<i>L. mucosae</i>	2
<i>L. agilis</i>	1	<i>L. delbrueckii</i>	3
<i>L. casei</i>	1	<i>L. salivarius</i>	1

Data are number of the *Lactobacillus*.

图 1 所示：随机挑选的 5 个乳酸杆菌菌株带型图谱一致，说明其中主要含一种乳酸杆菌。与此不同，有的样本分离的 5 个乳酸杆菌菌株图谱之间存在明显差异，表现出不同的带型，如图 2 所示，说明 T27 号阴道环境中可能存在多种不同的乳酸杆菌。不同个体分离到的 10 株弯曲乳酸杆菌亦存在差异，其带型存在多样性，说明弯曲乳杆菌具有多型性，见图 3，其中 T12-1、T29-5 和 T37-3 菌株带型图谱相似程度较高，关系较近。

### 2.3 产酸与产 $H_2O_2$ 的比较

图 4 可见在 12 h 到 24 h 这段时间内，随着培养时间的增加，10 株弯曲乳酸杆菌单位菌体密度产酸量增加，变化较快；24 h 到 36 h 时间段体密度产酸量变化不大，基本达到稳定，pH 值在 4 左右。经方差分析，10 株弯曲乳酸杆菌单位菌体密度产酸量无显著差异 ( $F=2.44 < F_{0.01}=2.59$ )。从图 5 中我们可以看到，弯曲杆菌各亚型间产  $H_2O_2$  能力存在显著差异 ( $F=7.48 > F_{0.01}=2.59$ )，其中 T22-3、T29-5 菌株产  $H_2O_2$  能力明显高于其他菌株，T6-1、T12-1、T25-3、T33-1、T35-4、T37-3 产  $H_2O_2$  能力较弱，而 T27-7

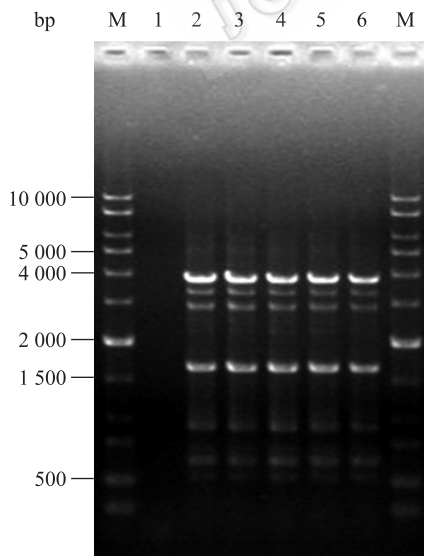


图 1 T49 样本乳酸杆菌 rep-PCR 带型图谱

Fig. 1 rep-PCR fingerprints of *Lactobacillus* strains from the sample T49. M: 1 kb plus DNA ladder marker; 1: control; 2: T49-1; 3: T49-2; 4: T49-3; 5: T49-4; 6: T49-5.

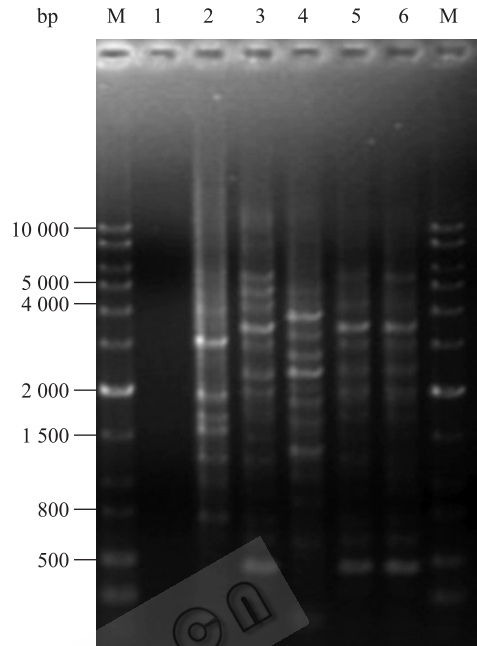


图 2 T27 样本乳酸杆菌 rep-PCR 带型图谱

Fig. 2 rep-PCR fingerprints of *Lactobacillus* strains from the sample T27. M: 1 kb plus DNA ladder marker; 1: control; 2: T27-1; 3: T27-2; 4: T27-3; 5: T27-4; 6: T27-5.

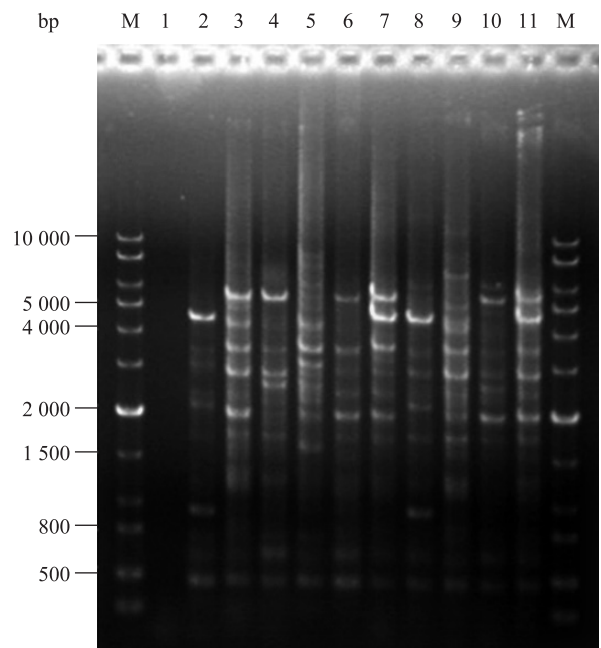


图 3 来自不同样本的弯曲乳酸杆菌 rep-PCR 带型图谱

Fig. 3 rep-PCR fingerprints of the 10 *L. crispatus* isolated from different samples. M: 1 kb plus DNA ladder marker; 1: control; 2: T6-1; 3: T12-1; 4: T22-3; 5: T29-5; 6: T27-7; 7: T29-5; 8: T31-3; 9: T33-1; 10: T35-4; 11: T37-3.

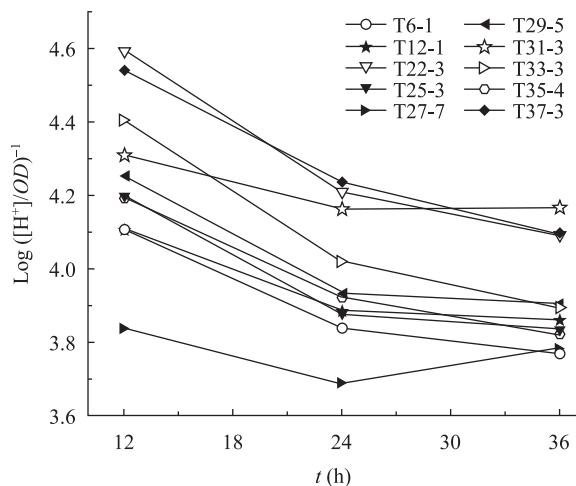


图4 10株弯曲乳杆菌产酸能力比较  
Fig. 4 Acid production of the isolated 10 *L. crispatus*.

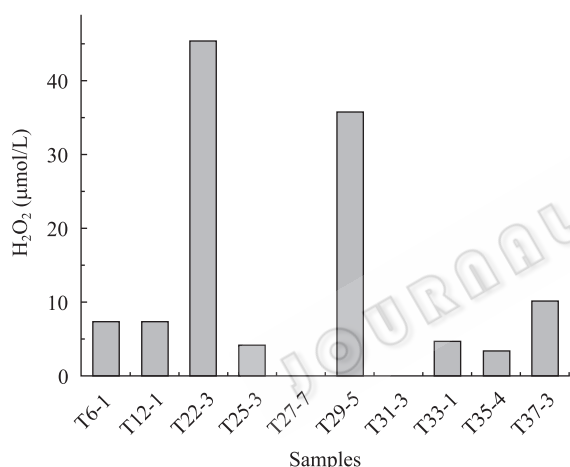


图5 10株弯曲乳杆菌产 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 比较  
Fig. 5 Hydrogen peroxide production of the 10 *L. crispatus*.

和 T31-3 菌株不产 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>。为此, 对于同种乳酸杆菌, 我们选择产 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 能力, 而不是单位菌体密度产酸量作为有益菌筛选指标之一。

### 3 讨论

乳杆菌作为一种益生菌已广泛应用于胃肠道疾病的治疗, *Lactobacillus casei rhamnosus* 乳杆菌通过 Lactocin 160 抑制致病菌的生长、调节胃肠道菌群平衡起到预防腹泻、治疗便秘的作用<sup>[15]</sup>。近年来, 在 BV 治疗方面也有较多相关报道, 如德氏乳

杆菌 DM8909 菌株 (商品名定菌生) 已在临床上用于 BV 的治疗。单一菌株治疗 BV 具有一定的局限性, 研究者们还应用多种乳杆菌联合治疗 BV, 将具有较强定植力的 *Lactobacillus brevis* (CD2) 乳杆菌与能产抗菌物质的 *Lactobacillus salivarius* (FV2) 乳杆菌和 *Lactobacillus plantarum* (FV9) 乳杆菌制备成混合菌剂, 取得了较好的治疗效果<sup>[4]</sup>。然而, 大多数菌剂的治愈率仅能达到 60%~70%<sup>[7]</sup>, 仍有必要继续寻找适合我国人群的用于防治 BV 的乳杆菌菌株。

本实验首次采用了 rep-PCR 技术, 对健康妇女阴道内弯曲乳杆菌种进行了初步的基因分型。rep-PCR 技术是一种分析细菌基因指纹图谱的新方法, 它是通过 PCR 扩增细菌基因的重复 DNA 片段来获得菌株特异性图谱。目前, 有两种主要的重复序列片段用于该方法中, 一种是基因外重复回文序列 (Repetitive extragenic palindromic elements, REP), 一种是基因间重复序列 (Enterobacterial repetitive intergenic consensus, ERIC), 本实验采用的是基因外重复序列, 它是 1 个长为 38 bp 的 DNA 片段, 由 1 个保守回文段及两端分别有 6 个简并位点和 1 个 5 bp 的可变框组成<sup>[16]</sup>。rep-PCR 技术具有高分辨力、高通量性、重复性好、费用低等特征, 是一种可靠的基因分型方法<sup>[17]</sup>。经 rep-PCR 技术我们发现正常阴道乳杆菌在不同个体的分布具有多样性, 有的妇女仅含有一种乳酸杆菌, 而有的妇女具有多种乳酸杆菌; 另外, 弯曲乳酸杆菌种间存在多样性, 健康妇女不同个体中的弯曲乳杆菌分离株存在不同基因型, 10 株弯曲乳杆菌样本带形图谱不相同, 我们可以推测个体抵抗致病菌侵袭以及包容外源益生菌能力的强弱可能与乳酸杆菌种类的多样性相关。这也能解释单一菌株的乳杆菌治疗 BV 疗效不一。

有报道乳杆菌产酸、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 能力与其抑菌能力成正相关<sup>[18]</sup>。乳杆菌通过产乳酸或其他脂肪酸来维持阴道酸性环境<sup>[19-20]</sup>。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 通过介导细菌 DNA 的破坏, 来抑制其他细菌的生长<sup>[21]</sup>。因此, 生态菌剂的

开发,还必须兼顾乳杆菌产酸、产  $H_2O_2$  能力等一些与治疗作用机理相关的理化特性。研究表明,产  $H_2O_2$  能力在弯曲乳杆菌不同型别存在较大差别,而同种乳杆菌产酸能力差别不大。

总之,健康妇女阴道内存在多种乳杆菌,且具有个体差异性,弯曲乳酸杆菌各型间产酸能力相差不大,而产  $H_2O_2$  能力差异明显。弯曲乳杆菌的多样性也为制备新型的益生菌剂提供了丰富的资源,为找到一种适用范围广的乳杆菌成为可能,我们可利用不同种、型间的优势并结合其产酸、产  $H_2O_2$  能力开发出一种含不同乳杆菌的混合菌剂来治疗 BV。选择乳杆菌益生菌治疗 BV 时,需要综合考虑阴道内乳杆菌的分布多样性,及其产酸、产  $H_2O_2$  能力,另外,还需要强调一点:乳杆菌与阴道上皮细胞粘附的能力与其能否在阴道成功定植有关,是乳杆菌持续作用的基础,也是乳杆菌治疗 BV 疗效的关键因素<sup>[22]</sup>。

## REFERENCES

- [1] Donati L, Di Vico A, Nucci M, et al. Vaginal microbial flora and outcome of pregnancy. Arch Gynecol Obstet, 2010, 281(4): 589–600.
- [2] Wilson BA, Thomas SM, Ho M. The Human Vaginal Microbiome//Metagenomics Human Body, Capter 6. Berlin: Springer-Verlag, 2011: 91–115.
- [3] Xu HY, Tian WH, Wan CX, et al. Antagonistic potential against pathogenic microorganisms and hydrogen peroxide production of indigenous *Lactobacilli* isolated from vagina of Chinese pregnant women. Biomed Environ Sci, 2008, 21(5): 365–371.
- [4] Antonio MA, Hawes SE, Hillier SL. The identification of vaginal *Lactobacillus* species and the demographic and microbiologic characteristics of women colonized by these species. J Infect Dis, 1999, 180(6): 1950–1956.
- [5] Damelin LH, Paximadis M, Mavri-Damelin D, et al. Identification of predominant culturable vaginal *Lactobacillus* species and associated bacteriophages from women with and without vaginal discharge syndrome in South Africa. J Med Microbiol, 2011, 60(Pt 2): 180–183.
- [6] Kaewsrichan J, Peeyananjarassri K, Kongprasertkit J. Selection and identification of anaerobic *Lactobacilli* producing inhibitory compounds against vaginal pathogens. FEMS Immunol Med Microbiol, 2006, 48(1): 75–83.
- [7] Wang YF, Lang JH, Yuan JL, et al. The phase II clinical trial of *L. delbrueckii* DM8909 in the patient with bacterial vaginosis. Chin J Microecol, 2001, 13(4): 198–201. 王友芳, 郎景和, 袁杰利, 等. 德氏乳杆菌 DM 8909 菌株对细菌性阴道病治疗的 II 期临床试验研究. 中国生态学报, 2001, 13(4): 198–201.
- [8] Shi Y, Chen LQ, Tong JQ, et al. Preliminary characterization of vaginal microbiota in healthy Chinese women using cultivation-independent methods. J Obstet Gynaecol Re, 2009, 35(3): 525–532.
- [9] Ling ZX, Kong JM, Liu F, et al. Molecular analysis of the diversity of vaginal microbiota associated with bacterial vaginosis. BMC Genomics, 2010, 11(488): 1471–2164.
- [10] Jia SF, Wang YY, Guo XH, et al. The factors affected transformation efficiency of *Lactobacillus* by electroporation. Chin J Biotech, 1998, 14(4): 429–433. 贾士芳, 王荫榆, 郭兴华, 等. 乳杆菌电转化条件的研究. 生物工程学报, 1998, 14(4): 429–433.
- [11] Antonio MAD, Hillier SL. DNA fingerprinting of *Lactobacillus crispatus* strain CTV-05 by repetitive element sequence-based PCR analysis in a pilot study of vaginal colonization. J Clin Microbiol, 2003, 41(5): 1881–1887.
- [12] Versalovic J, Schneider M, De Bruijin FJ, et al. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. Methods Mol Cell Bio, 1994, 5(1): 25–40.
- [13] Martín R, Suárez JE. Biosynthesis and degradation of  $H_2O_2$  by vaginal *Lactobacilli*. Appl Environ Microbiol, 2010, 76(2): 400–405.
- [14] Matu MN, Orinda GO, Njagi ENM, et al. *In vitro* inhibitory activity of human vaginal *Lactobacilli* against pathogenic bacteria associated with bacterial vaginosis in kenyan women. Anaerobe, 2010, 16(3): 210–215.
- [15] Petricevic L, Witt A. The role of *Lactobacillus casei rhamnosus* Lcr35 in restoring the normal vaginal flora after antibiotic treatment of bacterial vaginosis. BJOG, 2008, 115(11): 1369–1374.
- [16] Versalovic J, Koeuth T, Lupski JR. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. Nucleic Acids Res, 1991, 19(24): 6823–6831.

- [17] Gevers D, Huys G, Swings J. Applicability of rep-PCR fingerprinting for identification of *Lactobacillus* species. FEMS Microbiol Lett, 2001, 205(1): 31–36.
- [18] Reid G, Bruce AW, Mcgroarty JA, et al. Is there a role for *Lactobacilli* in prevention of urogenital and intestinal infections? Clin Microbiol Rev, 1990, 3(4): 335–344.
- [19] McLean NW, Rosenstein IJ. Characterisation and selection of a *Lactobacillus* species to re-colonise the vagina of women with recurrent bacterial vaginosis. J Med Microbiol, 2000, 49(6): 543–552
- [20] Rossi A, Rossi T, Bertini M, et al. The use of *Lactobacillus rhamnosus* in the therapy of bacterial vaginosis. Evaluation of clinical efficacy in a population of 40 women treated for 24 months. Arch Gynecol Obstet, 2010, 281(6): 1065–1069.
- [21] Holmes KK, Chen KCS, Lipinski CM, et al. Vaginal redox potential in bacterial vaginosis (nonspecific vaginitis). J Infect Dis, 1985, 152(2): 379–382.
- [22] Andreu A, Stapleton AE, Fennell CL, et al. Hemagglutination, adherence, and surface properties of vaginal *Lactobacillus* species. J Infect Dis, 1995, 171(5): 1237–1243.



## 中国科学院微生物研究所期刊广告部成立

中科院微生物研究所期刊广告部于 2007 年 3 月正式成立, 具有北京市工商行政管理局正式批准的广告经营许可证(京海工商广字第 8107 号)。广告部代理《生物工程学报》、《微生物学报》、《微生物学通报》、《菌物学报》四个期刊的广告经营业务, 此四种期刊均为中国自然科学核心期刊, 国内外公开发行, 主要报道微生物学、菌物学和生物技术领域的最新研究成果和研究动态, 已被美国化学文摘 (CA)、生物学文摘 (BA)、医学索引 (MEDLINE)、俄罗斯文摘杂志 (AJ)、Abstracts of Mycology (美国“菌物学文摘”)、Index of Fungi (英国“菌物索引”)、Review of Plant Pathology (英国“植物病理学文摘”)、Bibliography of Systematic Mycology (英国“系统菌物学文献目录”)、Bibliographie der Pflanzenschutz literature (德国“植物保护文献目录”)、《中国学术期刊文摘》、《生物学文摘》等等国内外著名数据库和检索期刊收录, 是促进国内外学术交流的重要科技期刊。

广告刊登内容主要包括大型生化仪器 (如显微镜、离心机、色谱仪、无菌操作台、大、中、小型发酵罐)、设备耗材 (如 PCR 仪、细胞生物反应器、微量移液器、离心管、杂交膜) 及生化试剂 (如各种酶、载体、试剂盒) 等的产品宣传信息, 也可以发布生物技术人才招聘信息、会议消息、以及与生命科学有关的各类服务信息。广告部以严谨、诚信为原则, 愿与从事生物技术产品生产与销售各类厂商和公司精诚合作, 共同发展。如果您有刊登广告的需要, 欢迎与我们电话或 email 联系获取各刊版位及报价信息! 也可以登陆各刊网站, 了解更多详情。

提示: 从 2007 年起, 各公司与此四刊签订的广告费用请通过新地址汇款 (收款单位: 中国科学院微生物研究所, 开户银行: 中国工商银行北京分行海淀镇支行, 帐号: 0200004509089117425)。

中国科学院微生物研究所·期刊广告部

联系电话: 010-64807336; 010-64807521 电子信箱: gg@im.ac.cn 联系人: 武文 王闵

网址: <http://journals.im.ac.cn>