

窖泥微生物群落 SSCP 分析条件优化的研究

卫春会^{1,2}, 黄治国^{1,2}, 甄攀¹

(1 四川理工学院生物工程学院, 四川 自贡 643000; 2 酿酒生物技术及应用四川省重点实验室, 四川 自贡 643000)

摘要: 由于窖泥微生物群落结构复杂, 而 PCR-SSCP 是研究环境微生物群落较理想的一种方法。试验对影响 SSCP 图谱的条件进行优化分析, 为窖泥微生物群落结构解析提供了有效的手段。结果表明: 变性缓冲液配比为: 去离子甲酰胺 1.9 mL, 溴酚蓝 3 mg, 5×TBE 250 μL, 0.5 M EDTA 5 μL, 10% SDS 5 μL; 凝胶条件为: 凝胶浓度为 12%、丙烯酰胺与 N,N'-亚甲基双丙烯酰胺的比例为 29:1, 无甘油。经 95℃ 变性 10 min, 4℃ 条件下 200V 电泳 8h 可得到较理想的图谱。

关键词: 窖泥; PCR-SSCP; 16S rDNA; 微生物群落

中图分类号: TS262.3 Q9333

文献标识码: A

引言

窖泥微生态中的微生物种类众多繁杂, 使用常规的培养基和培养条件进行微生物分离培养研究, 将会遗漏很多微生物种类, 甚至是对酿造大曲酒十分重要的种类。因此, 传统的研究方法只能反映出极少数微生物的信息, 所测结果误差较大, 埋没了大量极有价值的微生物资源。

聚合酶链式反应及单链构象多态性 (polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism, PCR-SSCP) 技术是一种检测 PCR 产物微小差异的有效方法。目前, SSCP 技术在突变检测上应用较多, 例如基因突变的鉴定、遗传病致病基因分析、基因诊断^[1]。但应用于微生物群落结构解析的研究较少, 因为 DNA 单链变异的性质不同, 从而它们在中性胶中的构象也具有很大的可变性, 对不同的研究对象, 至今仍无通用的最优 PCR-SSCP 条件可使用, 需要在实验过程中不断优化实验条件^[2]。因此, 本研究以 SSCP 技术分析窖泥微生物群落结构为例, 分析了凝胶浓度、交联度、甘油、变性缓冲液等因素对 SSCP 图谱的影响, 并提出了优化后的最佳条件。

1 材料与方法

1.1 试验材料

窖泥样品采自某酒厂白酒生产窖池, 迅速置于冰盒运回, -20℃ 保藏。

1.2 主要试剂

引物由上海英俊生物技术公司合成; TaqDNA polymerase, dNTPs, TaKaRa Taq™ DR100AM, DL500TM DNA Marker 购自大连宝生物工程有限公司; E.Z.N.A.™ soilDNA kit 购自美国 Omega 公司。

1.3 窖泥微生物总 DNA 的提取

称取 0.5g 样品, 采用 E.Z.N.A.™ soilDNA kit 提取微生物总 DNA。

1.4 PCR 扩增

16S rDNA 的 PCR 扩增选用引物 P11P (5'-GAGGA AGGTG GGGAT GACGT-3') 和 P13P (5'-AGGCC CGGA ACGTA TTCAC-3'), 可以扩增出 217bp 的片段^[4]。PCR 反应体系为 50 μL, 分别包括: 1.0 μL Taq 酶 (5U/μL), 5.0 μL 10×buffer, 3.0 μL MgCl₂ (25mmol/L), 2.0 μL dNTPs mixture (各 2.5mmol/L), 引物 (10 μmol/L) 各 1.5 μL, 5.0 μL 模板 DNA (100ng/L), 31.0 μL 灭菌双蒸水。PCR 扩增程序: 95℃ 预变性 5 min, 94℃ 50s, 60℃

收稿日期: 2010-06-25

基金项目: 四川省应用技术与开发项目 (07JY029-026); 自贡市 2008 年重点科技计划项目 (No.5); 酿酒生物技术及应用四川省重点实验室项目 (NJ2009-02)

作者简介: 卫春会 (1980-), 女, 陕西宝鸡人, 实验师, 硕士, 主要从事发酵工程方面的研究。

30s, 72°C 45s, 30个循环; 72°C延伸 5min

1.5 PCR产物检测

取 5 μ L PCR 产物, 加 1 μ L 6 \times loading buffer, 2% 琼脂糖胶, 120V 电泳 1h, EB 显色, 紫外灯下观察。

1.6 SSCP分析

在 10 μ L PCR 产物中加入 10 μ L 变性缓冲液, 煮沸变性 10min 后, 立即置冰水中放置 10min, 将变性后的样品点样于非变性聚丙烯酰胺凝胶中, 200V 电泳 8h, 银染, 拍照。

1.7 PCR-SSCP分析条件优化

在 SSCP 分析中, 不同的变性缓冲液的配比和聚丙烯酰胺凝胶条件, 对 SSCP 图谱的清晰度、灵敏度有很大的影响。本试验研究对 4 种不同的变性缓冲液配比 (表 1) 和 8 种不同的聚丙烯酰胺凝胶配比组合 (表 2) 对 SSCP 图谱质量的影响。

表 1 变性缓冲液优化

因素	试验 1	试验 2	试验 3	试验 4
去离子甲酰胺	1.9mL	1.9mL	1.9mL	1.9mL
溴酚蓝	3mg	3mg	3mg	3mg
5 \times TBE	250 μ L	无	250 μ L	无
0.5M EDTA (pH8.0)	5 μ L	5 μ L	无	无
10% SDS	5 μ L	5 μ L	无	无

表 2 凝胶条件优化方案

因素	胶浓度 (%)	交联度	甘油
试验 1	8	29:1	有
试验 2	8	29:1	无
试验 3	8	49:1	有
试验 4	8	49:1	无
试验 5	12	29:1	有
试验 6	12	29:1	无
试验 7	12	49:1	有
试验 8	12	49:1	无

2 结果与分析

2.1 PCR扩增产物

窖泥样品中微生物总 DNA 经引物 P11P 和 P13P 扩增后产生一条长度为 217bp 左右的 DNA 片段 (见图 1)。

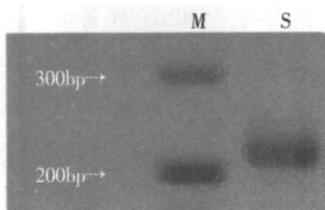


图 1 窖泥微生物 PCR 扩增结果

注: M: Marker 样品

2.2 SSCP技术的优化

2.2.1 变性缓冲液优化

试验 1~4 对应泳道 1~4 泳道 1 条带丰富且清晰, 变性效果最佳。泳道 2 相对于泳道 1, 迁移速率相对较慢, 条带丰度小且可读性较差。泳道 3 条带稀少且模糊不清。泳道 4 内, 几乎无可读出条带 (见图 2)。

2.2.2 凝胶条件优化

2.2.2.1 凝胶浓度优化

8% 的聚丙烯酰胺凝胶, 部分条带较粗, 且条带分布非常集中, 无法用于群落更迭规律的分析。而 12% 的胶, 条带的分离度及清晰度, 明显优于 8% 的胶 (见图 3)。

2.2.2.2 交联度优化

交联度为 49:1 时, 条带丰富度小; 当二者比例为 29:1 时, 分辨率高, 单链在其所形成的凝胶中泳动速度较慢, 使差异基因得以更好的分离, 条带丰富度大, 因此该条件形成的图谱条带分布范围较大 (见图 3)。

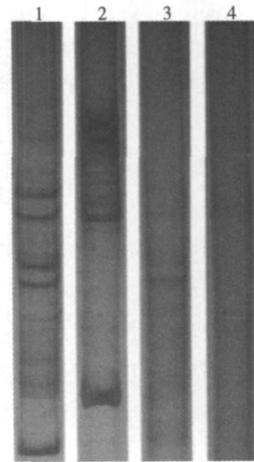


图 2 不同变性缓冲液配比优化结果

注: 其中 1~4 对应表 1 中试验 1~4

2.2.2.3 甘油对凝胶的影响

在加入甘油的凝胶图谱中, 8% 的 SSCP 图谱效果极差, 条带不清晰, 分离效果差; 而 12% 的 SSCP 图谱虽较 8% 的条带分离效果好一些, 但与同样条件不加甘油所形成的 SSCP 图谱性相比其多样性较差, 条带清晰度较低, 难以分辨优势菌群。

通过对上述试验条件的摸索, 8 种不同条件下形成的凝胶图谱中, 试验 6 的效果最好, 即: 浓度为 12% 的非变性聚丙烯酰胺凝胶 (交联度为 29:1)、不加甘油为最佳条件组合。重复试验证实了该结果 (见图 3)。

3 讨论

SSCP 分析的原理是当双链 DNA 变性后, 得到一种序列特异、构象特异的单链结构, 不同的构象在非变性聚丙烯酰胺凝胶中泳动性不同^[3]。Orita 等^[4]认为 SSCP 分析对于小于 300bp 的 PCR 产物最有效。

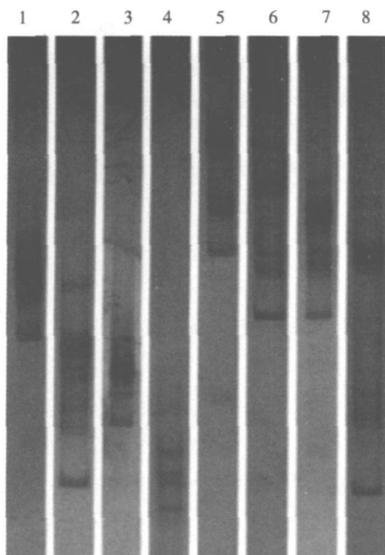


图 3 不同凝胶条件 SSCP 图谱

注: 其中 1~8 分别对应表 2 中试验 1~8

3.1 变性缓冲液的配比对 SSCP 的影响

热变性是分子生物学研究中经常采用的 DNA 变性手段, 但为了提高变性的效果和均一性, 往往采用需要添加化学变性剂。甲酰胺是常用的变性剂, 既能降低双链 DNA 解链温度 (T_m), 同时提高完全变性的频率。9% 去离子甲酰胺可使双链 DNA 解链温度下降 $60^{\circ}\text{C}^{[5]}$ 。因此, 可在热变性前向样品中加入变性剂, 以确保 DNA 链的完全解离与伸展。

由变性缓冲液优化试验结果可知, 变性缓冲液如果只有高浓度去离子甲酰胺, 所得 SSCP 图谱, 无可读条带, 可能是由于没有 $5\times\text{TBE}$ 、EDTA、SDS 对变性后的单链进行稳定, 在温度下降后, 单链重新结合为双链 DNA。变性缓冲液中加入一定量的 $5\times\text{TBE}$, 保持溶液 pH 相对稳定, 可能对单链 DNA 的构象有一定的保护作用。

3.2 凝胶条件对 SSCP 的影响

3.2.1 凝胶浓度对 SSCP 图谱的影响

凝胶浓度对 DNA 样品的迁移速率有较大的影响, 对于碱基数较少的 DNA 样品 (小于 300bp), 应当选择较高浓度凝胶 (大于 10%), 否则将导致有些条带无法分开。本试验中 12% 凝胶的条带清晰度远优于 8% 胶浓度样品, 说明高浓度胶的分辨率高, 能使序列相差较小的条带分开, 进一步显示多态性。

3.2.2 交联度对 SSCP 图谱的影响

SSCP 分析中使用非变性聚丙烯酰胺凝胶。凝胶的孔径由链长和交联度决定, 链长则取决于聚合反应中丙烯酰胺的浓度^[6]。凝胶浓度与丙烯酰胺和 N, N'-亚甲基双丙烯酰胺的比例, 还会影响 PCR 扩增产物变性后单链状态下的构象。如果比例异常, 会使单链 DNA 在凝胶中形成稳定构象或不稳定的亚构象状态^[7]。49:1 交

联度电泳速度较快, 条带分离效果较好, 表明高交联度有可能会促进某些 SSCP 条带的分离^[8]。但条带清晰度相对较差, 可能是由于在此交联度下, 单链 DNA 并不完全是稳定的构象。

3.2.3 甘油对 SSCP 图谱的影响

甘油对 SSCP 条带泳动的影响较为复杂, 有文献报道, 在非变性的聚丙烯酰胺中加入 5% 的甘油, 可提高 SSCP 检测的灵敏度^[9]。但丁兰^[10]等研究发现凝胶中添加甘油后, 单链 DNA 泳动差异缩小, 条带难以分辨, SSCP 分析的灵敏度下降。本试验研究发现甘油对单链的迁移速度影响较大, 无甘油时条带清晰, 相距较远, 易分辨, 而加入甘油后, 单链排列紧密, 多态性较差。

4 结束语

PCR-SSCP 技术进行窖泥微生物群落结构分析时, 由于窖泥群落结构复杂, 群落结构存在动态变化, 因此对 SSCP 技术要求较高^[11]。本试验通过 SSCP 条件优化分析, 结果表明, 当核酸片段长度约为 217bp 时: (1) 变性缓冲液配比为: 去离子甲酰胺 1.9mL、溴酚蓝 3mg、 $5\times\text{TBE}$ 250 μL 、0.5M EDTA 5 μL 、10% SDS 5 μL ; (2) 凝胶条件为: 凝胶浓度为 12%、丙烯酰胺与 N, N'-亚甲基双丙烯酰胺的比例为 29:1、无甘油。经 95°C 变性 10min、 4°C 条件下 200V 电泳 8h 可得到较理想的图谱。总之, 对于 PCR-SSCP 的研究近年来逐渐受到重视, 尽管如此, 但此方法在酿酒微生物方面应用还较少, 本试验对此方法的一些摸索, 可作为以后应用此方法开展酿酒微生物研究的参考。

参考文献

- [1] 罗惠波, 李浩, 黄治国, 等. 浓香型大曲微生物群落结构的 PCR-SSCP 分析条件优化 [J]. 四川理工学院学报: 自然科学版, 2009, 22(4): 72-74.
- [2] 杨志惠, 周斌, 贾静, 等. PCR-SSCP 分析参数的研究 [J]. 泸州医学院学报, 2005, 28(5): 391-393.
- [3] Orita M, Suzuki Y, Sekiya T, et al. Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction [J]. *Genomics* 1989, 86(5): 874-879.
- [4] Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, et al. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, 86(8): 2766-2770.
- [5] 赵广荣, 郭晓静, 元英进, 等. 核酸单链构多态性技术研究进展 [J]. 化工进展, 2005, 24(3): 378-382.

- [6] 赵 焱. ABR系统微生物群落的 SSCP基因指纹分析[D]. 哈尔滨工业大学, 2006 54-55
- [7] 刚 锰, 葛 辉, 王洪月, 等. 凝胶浓度对 SSCP技术的影响[J]. 河北渔业, 2009(5): 20-22
- [8] 魏太云, 林含新, 谢联辉. PCR-SSCP分析条件的优化[J]. 福建农林大学学报: 自然科学版, 2002, 31(1): 32-52
- [9] Spinardi L, Mazars R, Theillet C. Protocols for an improved detection of point mutations by SSCP[J]. *Nucleic Acids Research*, 1991, 19(14): 4009
- [10] 芒, 张思仲, 周宏远, 等. 有和无甘油的聚丙烯酰胺胶在检测突变时的差别[J]. 遗传, 2001, 23(3): 266-268

Study on Optimal Conditions of SSCP Analysis Technology for the Microbial Community in Pit Mud

WEI Chun-hui^{1,2}, HUANG Zhi-guo^{1,2}, ZHEN Pan¹

(1. School of Biotechnology Engineering Sichuan University of Science & Engineering Zigong 643000 China

2. Liquor Making Biotechnology & Application of Key Laboratory of Sichuan Province, Zigong 643000 China)

Abstract The microbial community structure of pit mud is complex, but PCR-SSCP is a more ideal method on environmental microbial community. The experiment analyzed conditions of SSCP profile providing effective means for analysing microbial community structure. The results indicates that Loading buffer was deionized formamide being 1.9mL, bromophenol blue being 3mg, 5×TBE 250μL, 0.5M EDTA 5μL and 10% SDS 5μL; Condition of gel was concentration being 12%, the proportion of acrylamide and N, N'-methylene-bis-acrylamide being 29:1, without glycerine. Denatured at 95°C for 10min, 4°C, 200V, electrophoresis 8h finally get perfect spectrogram.

Key words pit mud; PCR-SSCP; 16S rDNA; microbial community

(上接第 688页)

参考文献:

- [1] 曹宝忠. 甜面酱生产技术探讨[J]. 中国酿造, 2005, 25(7): 1-4.
- [2] 李海梅, 马 莺. 黄豆酱的生产现状及发展方向[J]. 中国调味品, 2004(10): 8-12.
- [3] 李红玫. 甜面酱生产新工艺[J]. 中国调味品, 2004, (12): 25-26.
- [4] 马新村. 甜面酱酿制技术[J]. 中国调味品, 2001, (8): 28-30
- [5] 杜风刚. 合理规范关键工序提高甜面酱质量[J]. 中国酿造, 2005, (8): 44-47.
- [6] 张 英. 食品理化与微生物检测[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2004

Study on Application of Compound Antiseptic in Fermented Flour Paste

FENG Zhi-ping, WU Shi-ye

(School of Biotechnology Engineering Sichuan University of Science & Engineering Zigong 643000 China)

Abstract In this paper for sodium benzoate, potassium sorbate and Nipagin ester formed compound antiseptic between two with a preservative used to improve the preserved properties of fermented flour paste. The fermented flour paste added compound antiseptic, stored at 28°C for 6 weeks, every week measured the changes of its physical-chemical and microbial indicators in order to examine the preservative effect of compound antiseptic. Experimental results showed that combined 0.4g/kg sodium benzoate with 0.2g/kg potassium sorbate to compose compound preservative, its preservative effect is best.

Key words fermented flour paste; compound antiseptic; preservation