

PCR - DGGE 用于浓香型大曲微生物群落分析的条件优化

王世宽¹, 侯 华², 袁城金¹, 谢仁有¹, 洪玉程¹

(1. 四川理工学院生物工程学院, 四川 自贡 643000; 2. 四川江口醇酒业(集团)有限公司, 四川 巴中 636400)

摘 要: 试验对浓香型大曲微生物群落的 PCR - DGGE 电泳最佳变性剂梯度范围、电泳时间进行了优化。结果表明: 细菌 DGGE 电泳最佳变性剂浓度梯度为 35% ~ 55%; 而真菌 DGGE 电泳最佳变性剂浓度梯度为 30% ~ 50%。通过时间进程法得出最佳电泳时间为 16 小时。运用此优化后的 PCR - DGGE 技术对不同时期曲药微生物群落进行了研究, 获得了较丰富的微生物多样性。

关键词: 浓香型大曲; 微生物; PCR - DGGE; 变性剂

中图分类号: Q145

文献标识码: A

大曲的发明及运用在我国已有几千年的历史^[1]。大曲是以小麦、大麦和豌豆等为原料, 经破碎、加水拌料、压成砖块状的曲坯后, 在人工控制温度、湿度下培养而成^[2]。曲块经过自然接种^[3], 使得大曲中的微生物极为丰富, 是多种微生物的混合体系^[4]。它作为白酒发酵生产中微生物及酶的主要来源, 它的质量直接关系到出酒率及基酒的质量^[5]。“生料制曲、自然接种”的生产方式, 受到环境、地域、原料、季节等因素的影响, 使得曲药质量不稳定, 波动很大。本质上是受到曲药中微生物种群的影响。

传统研究都是使用常规培养基和优化培养条件进行微生物分离培养研究。相当多的菌种没能被发现, 使得其研究结果不够全面。因此, 利用免培养方法从曲药中提取微生物 DNA 对菌种进行检测, 得到更加全面的菌种讯息, 其研究结果更具有全面性, 更加有利于指导曲药的生产。

DGGE 技术在一般的聚丙烯酰胺凝胶基础上, 加入了变性剂(尿素和甲酰胺)梯度或是温度梯度, 从而能够把同样长度但序列不同的 DNA 片段区分开, 一个特定的 DNA 片段有其特有的序列组成, 其序列组成决定了其解链区域(melting domain, MD)和解链行为(melting behavior)^[6-7]。本文对浓香型大曲微生物中 DNA 的 DGGE 条件及其 DGGE 图谱进行了分析, 旨在得到大曲微生物更加全面的菌种信息, 了解曲药在成熟过程中微

生物种群的多样性及其变化规律, 以便更加有利于指导曲药的生产。

1 材料和方法

1.1 曲药来源

研究所用的曲药由泸州老窖公司生产的“久久牌”曲药。取不同时期的曲药, 装入无菌塑料袋内封口, 带回实验室 - 20 ℃ 保存备用。

1.2 试剂

实验主要使用的试剂: 蛋白酶 K (Merck 公司), SDS (Sigma 公司), 琼脂糖 (华美生物工程公司), PCR 所用试剂 (Taq 酶, dNTP 等) (大连宝生物工程有限公司), 16S rDNA 细菌通用引物 8f 和 519r (上海英俊生物技术公司合成), E. Z. N. A. TM soil DNA kit (omega 公司)。

1.3 仪器

本实验主要使用仪器: My Cycler 型 PCR 仪 (伯乐生命科学产品(上海)有限公司), Power Pac Basic 型恒压恒流电泳仪 (美国 Bio-rad 公司), SW - CG - 1F 型超净工作台 (苏州苏洁净化设备有限公司), UNIVERSAL 32R 型高速冷冻离心机 (德国 Hettich 公司), JY - SP - C 型水平电泳槽 (北京君意东方电泳设备有限公司), KS 4000 I control 恒温控制摇床 (德国 IKA 公司), DYCZ - 24A 型垂直电泳槽 (北京六一仪器厂), Bio - Best200E 型凝胶成像分析系统 (美国 SIM 公司)。

收稿日期: 2012-04-29

基金项目: 四川省科技厅自然科学基金项目(2008JY0091)

作者简介: 王世宽(1964-), 男, 重庆人, 教授, 硕士, 主要从事农产品储藏与加工方面的研究, (E-mail) sclgws@ yahoo. com. cn

1.4 试验方法

1.4.1 曲药样品处理

对所采集曲块,从区块的上表面、下表面、曲心、曲皮、曲表、曲角分割出 50g,磨碎混合。

1.4.2 曲药总 DNA 提取

取 5g 样品,采用 SDS-酶法^[8-9],从样品中提取基因组总 DNA。

1.5 曲药总 DNA PCR 扩增

1.5.1 试验引物

试验所用引物见表 1^[10-11]和表 2^[12]。

表 1 细菌 16SrDNA V3 区引物序列

引物名	序列
P1	5' - CCTACGGGAGGCAGCAG - 3'
519r	5' - ATTACCGCGGCTGCTGG - 3'

表 2 真菌 18SrDNA 引物序列

引物名	序列
EF-4f	5' - GGAAGGG(A/G)TGTATTTATTAG - 3'
Fung-5r	5' - GTAAAAGTCCTGGTTC - 3'

1.5.2 PCR 反应体系

PCR 50 μ L 反应体系:0.5 μ L Taq 酶(5 U/ μ L),5.0 μ L 10 \times buffer,3.0 μ L MgCl₂(25 mM),2.0 μ L dNTPs Mixture(各 2.5 mM),1.5 μ L 引物 I(10 μ M),1.5 μ L 引物 II(10 μ M),5.0 μ L 模板 DNA(100 ng/ μ L),31.5 μ L 灭菌双蒸水。

1.5.3 扩增反应参数

95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min,95 $^{\circ}$ C 热变性 1 min,54 $^{\circ}$ C 退火 1 min,72 $^{\circ}$ C 延长 1.5 min,共 30 个循环;最后冷却到 4 $^{\circ}$ C。反应结束后,-20 $^{\circ}$ C 保存。

1.6 变性剂梯度浓度的优化

采用水平变性梯度凝胶电泳分析曲药微生物群落多样性之前,首先利用垂直变性梯度凝胶电泳了解待测 DNA 片段的电泳迁移率与变性剂之间的关系,从而确定 DGGE 凝胶中变性剂的梯度范围,以提高分析结果的准确性与可靠性。

1.7 电泳时间的优化

电泳时间的长短,直接关系到后续结论分析的准确度,故本实验使用时间进程法来确定最佳的电泳时间。在时间为 0 h、1 h、2 h、4 h、8 h、12 h、16 h 时,对其点样,进行时间的优化。

2 结果与分析

2.1 最佳变性剂梯度浓度的确定

DGGE 分析微生物多样性,首先根据垂直电泳来确定变性剂的梯度范围,然后使用水平电泳对样品进行分析^[13-14]。垂直电泳变性剂的浓度呈梯度变化,DNA 进入胶片后,在一段 DNA 片段以双链形式电泳,一段以解

链形式电泳,而在胶的中间,则是两种形态同时存在,造成 DNA 在电泳时的迁移率不同,得到 S 形的电泳轨迹。

在曲药成熟过程中,以曲药微生物的 DNA 为模板,分别用细菌 16S rDNA V3 区与真菌 18S rDNA 引物进行 PCR 扩增,然后使用 DGGE 垂直电泳进行分离。如图 1、图 2 所示,细菌 16S rDNA 的 PCR 扩增产物在 DGGE 垂直电泳中完全分离开的变性剂浓度范围在 35% ~ 55% 之间。真菌 18S rDNA 的 PCR 扩增产物在 DGGE 垂直电泳中完全分离开的变性剂浓度范围在 30% ~ 50% 之间。所以在 DGGE 水平电泳中,曲药中细菌 PCR 扩增产物的变性剂最佳浓度在 35% ~ 55%,真菌 PCR 扩增产物的变性剂最佳浓度在 30% ~ 50%。

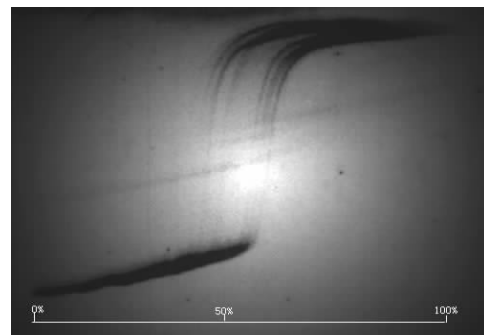


图 1 细菌 16S rDNA V3 区的 PCR 产物的 DGGE 垂直电泳图谱



图 2 真菌 18S rDNA 的 PCR 产物的 DGGE 垂直电泳图谱

2.2 最佳电泳时间的确定

最佳电泳时间的确定在 DGGE 水平电泳中尤为重要,在最佳的时间使 DNA 片段达到最佳的分离效果。本试验采用时间进程法来确定最佳电泳时间,即在电泳过程中按照倍数法则,分别在电泳开始的 0 h、1 h、2 h、4 h、8 h、12 h、16 h 点样。结果表明,在不同起始时刻电泳,条带出现不同的分散度,而且条带数目也出现差异。如图 3 所示,从 1 号泳道到 6 号泳道,条带的分散度逐渐加大,到 6 号泳道达到最佳,2 ~ 5 号泳道出现的条带数基本相同,但是相对于 6 号泳道,其分散度稍微欠缺,同时 2、3 号泳道的条带太过于集中在一个区,这说明,可

能在该区存在没有分散开的条带。故选择 6 号泳道及电泳最佳时间为 16 h。

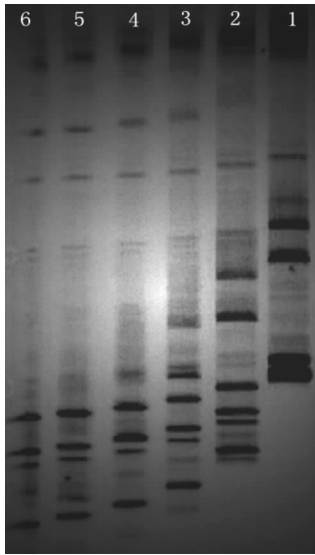


图 3 不同点样时间的 DGGE 图谱

2.3 曲药微生物的 DGGE 图谱分析

2.3.1 曲药微生物细菌 16S rDNA PCR 产物的 DGGE 图谱分析

应用优化得到的 PCR - DGGE 电泳条件,对不同时期曲药中的细菌群落情况进行分析,由图 4 可以看出,每个泳道均出现清晰条带,条带数在 5 ~ 9 之间,说明曲药样品细菌 16S rDNA 的 PCR 产物通过 DGGE 水平电泳能够较好的分离。由图谱中清晰的条带的变化可以判定在曲药成熟过程中,其细菌的种类处于动态变化中。在此变化过程中,有的前后相邻条带出现了增加或者减少,5、15 号条带一直存在于每个曲药成熟阶段。1、2、16、17 号条带出现在曲药成熟前期,说明在成熟过程中,细菌处于动态变化。10、12 号条带在发酵后期出现,说明在曲药发酵前期这些细菌不影响曲药的形。在条带中,如 13、12 号条件亮度明显高于其它条带,说此种细菌在曲药中含量较大。反之则含量越少,如 1 号条带。

在曲药发酵前期,对应于图谱中的 1、2、3 号泳道,13 号条带一直存在,且亮度逐渐减少,说明该细菌的量在逐渐减少;15 号条带,亮度逐渐增加,说明该细菌的量在增加;在曲药发酵中期,对应图谱中 4、5、6 号泳道,表现出的条带基本相似,说明该阶段细菌的量处于一个平衡状态,与发酵前期对比发现,很多细菌在这一时期出现,如 3、11 号条带。在发酵后期及成熟期,对应 7 ~ 11 号泳道,很多条带的亮度降低,同时在发酵前期和中期出现的条带在发酵后期消失,这都说明在发酵过程中细菌处于一个动态变化过程。

2.3.2 曲药微生物真菌 18S rDNA PCR 产物的 DGGE

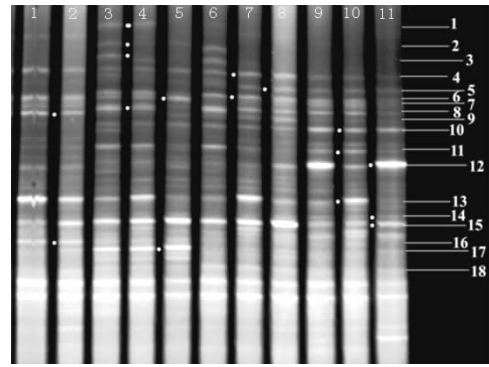


图 4 16S rDNA 的 PCR 扩增产物的 DGGE 图谱
(1 ~ 3 曲药发酵前期,4 ~ 6 曲药发酵中期,
7 ~ 10 曲药成熟期,11 为成熟曲药)

图谱分析

应用优化得到的 PCR - DGGE 电泳条件,对不同时期曲药中的真菌群落情况进行分析,由图 5 可知,每个泳道均出现清晰条带,条带数在 5 ~ 9 之间,说明曲药样品真菌 18S rDNA 的 PCR 产物通过 DGGE 水平电泳能够较好的分离。由图谱中清晰的条带的变化可以判定在曲药成熟过程中,其真菌的种类处于动态变化中。在曲药成熟过程中,出现非常均匀的条带,且亮度较大,同时发酵后期相对于发酵前期,出现了新的条带,如 1、2、3、4 号条带。就整个发酵过程而言,真菌的条带基本变化不大,但在发酵后期至成熟期,其真菌的条带在逐渐减少且亮度降低,说在发酵过程中,曲药中的各类养分的减少使得真菌量的减少,甚至死亡。

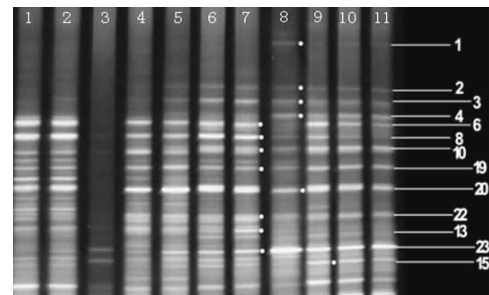


图 5 真菌的 PCR 扩增产物的 DGGE 图谱
(1 ~ 3 曲药发酵前期,4 ~ 6 曲药发酵中期,
7 ~ 10 曲药成熟期,11 为成熟曲药)

3 讨论

经过试验发现,曲药中基因组 DNA 的 PCR 的扩增产物在 DGGE 中,最佳变性剂浓度为,细菌 16S rDNA 的 PCR 扩增产物在 DGGE 垂直电泳中完全分离的变性剂浓度范围在 35% ~ 55% 之间。真菌 18S rDNA 的 PCR 扩增产物在 DGGE 垂直电泳中完全分离的变性剂浓度范围在 30% ~ 50% 之间。通过时间进程法得出最佳电泳时间为 16 小时。

在曲药的生产到成熟过程中,曲药中的微生物不断

变化,种群数量,种群的多样性都是一个动态变化过程,就细菌而言,曲药人工培养起始阶段,细菌的量大于曲药成熟后的量,但是就真菌而言,菌落数量在曲药的成熟过程中是一个恒定的状态。

在使用 PCR - DGGE 对曲药进行多样性分析过程中发现,该方法用于曲药的生产过程中曲药中微生物变化过程的研究是有效的。电泳过程中,能够很好的分离出曲药中的微生物 DNA。同时认为,研究曲药中微生物多样性,应该科学的对曲药的样品进行收集,同时要考察不同季节,不同曲药位置,不同曲房等因素对曲药的影响。

曲药是作为白酒生产的前体物质,在后续研究中,应该联系白酒产量、质量与曲药的关系,尤其白酒香味物质与曲药的关系。以便生产出更加优质的白酒。

参考文献:

- [1] 陈 驹.中国酿酒技术的过去、现在与将来[J].中国酿造,1991(9):2-8.
- [2] 王海平.大曲生产的改进[J].酿酒,1994(2):1-4.
- [3] 李大和,黄圣明.浓香型曲酒生产技术[M].北京:轻工业出版社,1991.
- [4] 李云英,李能树.大曲酒微生物区系的初步研究[J].生物学杂志,2006(3):19-21.
- [5] Fu Yingsong,Wang Zhangyan,Deng Xiaochen,et al. Ecology of liquor making industry and its development [J].Liquor making Science and Technology,2000(1):22-23.
- [6] 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 Res,1985,(13):3131-3145.
- [7] Myers R M,Fischer S G,Maniatis T,et al.Modification of themelting properties of duplex DNA by attachment of a GC-rich DNA sequence as determined by denaturing gradient gel electrophoresis[J].Nucleic Acids Res,1985,(13):3111-3129.
- [8] 胡 佳,邓 斌.浓香型白酒曲药中细菌组成及系统学分析[J].酿酒科技,2007(5):17-19.
- [9] F.奥斯伯.精编分子生物学实验指南[M].北京:科学出版社,1998.
- [10] Krsek M,Wellington E M H.Comparison of Different Methods for the Isolation and Purification of Total Community DNA from Soil[J].Journal of Microbiological Methods,1999(39):1-16.
- [11] Vainio E J,Hantula J.Direct Analysis of Wood-inhabiting Fungi Using Denaturing Gradient gel Electrophoresis of Amplified Ribosomal DNA E [J]. Mycol Res,2000(104):927-936.
- [12] Judith Meis, Chen Fengling. Extract PCR-ready Soil DNA in Less than an Hour with the New Soil Master DNA Extraction Kit[J].Epicentre Forum,2002,9(2),1-3.
- [13] Zhang Dan, Zhang Demin. Community analysis of ammonia oxidizer in the oxygen-limited nitrification stage of OLAND system by DGGE of PCR amplified 16S Rdna fragments and FISH[J].Journal of Environmental Sciences,2004,16(5):838-842.
- [14] 罗惠波,侯海波,黄治国.大曲真核微生物群落 PCR-DGGE 电泳条件优化[J].四川理工学院学报:自然科学版,2011,24(5):515-518.

Optimization of Denaturing Gradient Gel Electrophoresis for Microbial Communities in Luzhou-flavor Daqu

WANG Shi-kuan¹, HOU Hua², YUAN Cheng-jin¹, XIE Ren-you¹, HONG Yu-cheng¹

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

2. Sichuan Jiangkouchun Group, Bazhong 636400, China)

Abstract: Polymerase chain reaction and denaturing gradient gel electrophoresis (PCR-DGGE) technique is used to reveal the Microbial Communities in Luzhou-flavor Daqu. In order to improve the accuracy, sensitivity and repeatability of DGGE, the running parameters of DGGE are optimized by level electrophoresis and electrophoresis time. The results show that the best range of denaturing gradients is 35% ~ 55% of DGGE of bacteria; the best range of denaturing gradients is 30% ~ 50% of DGGE of fungi; the best electrophoretic time is 16 hours through the time process method. The Daqu microbial community of different periods is researched by the optimized PCR-DGGE technology, and rich microbial diversity is obtained.

Key words: Luzhou-flavor Daqu; microorganism; PCR-DGGE; denaturant