

# 大曲真核微生物群落 PCR - DGGE 电泳条件优化

罗惠波, 侯海波, 黄治国, 卫春会, 叶光斌

(四川理工学院酿酒生物技术及应用四川省重点实验室, 四川 自贡 643000)

**摘要:** 试验将 DGGE 方法应用于大曲真核微生物的研究, 并对其电泳条件进行优化; 对大曲真核微生物的 18S rDNA 优化出的 DGGE 电泳条件为: 胶浓度 8%, 变性范围 40% ~ 70%, 电压条件先采用 200 V、4 min, 再采用 130 V、14 h, 获得的 DGGE 图谱具有较好的分离效果。

**关键词:** 大曲; 真核微生物; PCR - DGGE

**中图分类号:** Q145<sup>+</sup>2

**文献标识码:** A

白酒的生产是以窖池和酒醅为基础, 环境微生物、大曲微生物和窖泥微生物进行着复杂的物质能量代谢<sup>[1]</sup>。大曲富含丰富的微生物, 这些微生物代谢可产生淀粉酶、糖化酶、蛋白酶和酯化酶等<sup>[2]</sup>, 大曲真核微生物对白酒的产酒、生香和产酯等方面起着十分重要作用。研究大曲微生物群落多样性, 阐明微生物群落组成及其与生化指标的联系, 综合、客观、动态地判断大曲质量的优劣, 才能建立大曲生产标准, 使大曲生产科学化<sup>[3]</sup>。

对于大曲微生物的研究以前主要采用常规的分离培养方法, 通过纯培养得到的大曲微生物主要有霉菌、细菌、酵母菌和放线菌等<sup>[4]</sup>, 但是常规培养方法耗时长, 准确率低, 且可培养的微生物仅占其微生物总类的 0.1% ~ 10%。随着分子生物学的发展, 基因指纹图谱技术越来越多的应用于微生物群落结构的研究中<sup>[5]</sup>。本试验利用 PCR - DGGE (Polymerase chain reaction - denaturing gradient gel electrophoresis, 聚合酶链式反应 - 变性梯度凝胶电泳) 技术来研究大曲真核微生物群落结构, 并对电泳条件进行优化, 为大曲真核微生物群落的研究提供方便、快捷、可靠的研究手段。

## 1 材料与试验方法

### 1.1 试验材料

中高温大曲样品采自四川泸州老窖酒厂, 高温大曲样品采自四川郎酒集团。无菌取样, 迅速用冰盒送回实

验室, -20 °C 保存, 尽快提取大曲微生物基因组 DNA。

### 1.2 主要试剂和仪器

E. Z. N. A. TM soil DNA kit (美国 Omega 公司); Taq DNA polymerase (大连宝生物工程有限公司); 去离子甲酰胺 (德国 AppliChem)。PCR 仪 (美国 BIORAD 公司 My cycle); DGGE 电泳仪 (美国 BIORAD 公司 DCode); 凝胶成像系统 (美国 SIM 公司)。

### 1.3 引物设计

本试验采用近年来较常采用的四对真核微生物引物 (表 1)。

表 1 用于 18S rDNA 扩增的引物

| 引物                                    | 引物序列(5' - 3')  | 扩增片段长度 |
|---------------------------------------|--|--------|
| FF390,<br>FR1 - GC <sup>[6]</sup>     | FF390:CGATAACGAACGAGACCT<br>FR1 - GC:GC 夹 - AICCATTCATTCGG-<br>TAIT              | 430bp  |
| EF4,<br>NS - GC <sup>[7]</sup>        | EF4:GGAAGGGRTGTATTATTAG<br>NS - GC:GC 夹 - TGCTGGCAC-<br>CAGACTTGC                | 400bp  |
| nu0817,<br>nu1196 - GC <sup>[8]</sup> | nu0817:TTAGCATGGAATAATRRRAATAGGA<br>nu1196 - GC:GC 夹 - TCTGGACCTG-<br>GTGAAGTTCC | 422bp  |
| Fung5,<br>EF4 - GC <sup>[9]</sup>     | Fung5:GTAAAAGTCTCTGGTTCCCC<br>EF4 - GC:GC 夹 - GGAAGGGRTG-<br>TATTATTAG           | 600bp  |

注: 在含 GC 夹引物的 5' 端加了一个富含 GC 序列 (40bp): CGC CCG GGG CGC GCC CCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG G

收稿日期: 2011-09-19

基金项目: 四川省科技厅应用基础项目 (07JY029-026; 2008 JY0091); 四川省教育厅重大培育项目 (07ZZ018); 四川理工学院引进人才项目 (2007-18)

作者简介: 罗惠波 (1969-), 男, 四川自贡人, 教授, 主要从事酒类发酵方面的研究, (E-mail) sgxlhb@yahoo.com.cn

### 1.4 大曲微生物总 DNA 提取及纯化

采用 E. Z. N. A. TM soil DNA kit 提取大曲微生物总 DNA, 然后用核酸蛋白检测仪检测 DNA 的浓度和纯度, 保存于  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  备用。

### 1.5 PCR 扩增

PCR 反应体系为(50  $\mu\text{L}$ ): 1.0  $\mu\text{L}$  Taq 酶(5 U/ $\mu\text{L}$ ), 5.0  $\mu\text{L}$  10  $\times$  buffer, 3.0  $\mu\text{L}$  MgCl<sub>2</sub> (25 mmol/L), 4.0  $\mu\text{L}$  dNTPs Mixture (各 2.5 mmol/L), 引物(10  $\mu\text{mol/L}$ ) 各 2.0  $\mu\text{L}$ , 2.0  $\mu\text{L}$  模板 DNA (100 ng/L), 31.0  $\mu\text{L}$  灭菌双蒸水。

PCR 扩增程序: ①引物 FF390, FR1 - GC 采用如下程序: 95  $^{\circ}\text{C}$  预变性 2 min; 95  $^{\circ}\text{C}$  变性 30 s, 55  $^{\circ}\text{C}$  退火 30 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 10 min, 共计 30 个循环, 最后 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 30 min; ②引物 EF4, NS - GC; nu0817, nu1196 - GC; Fung5, EF4 - GC 采用如下程序: 95  $^{\circ}\text{C}$  预变性 9 min; 95  $^{\circ}\text{C}$  变性 1 min, 48  $^{\circ}\text{C}$  退火 1 min, 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 1 min, 共计 35 个循环, 最后 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 10 min。

### 1.6 DGGE 电泳条件优化

首先进行垂直电泳, 确定聚丙烯酰胺凝胶的变性范围, 经反复试验选取聚丙烯酰胺凝胶变性范围为 40% ~ 70% (100% 的变性剂中含有 7 mol/L 的尿素和 40% 的去离子甲酰胺), 胶的浓度分别选 6%, 8% 进行试验。胶的规格为 20 cm  $\times$  20 cm, 厚 1 mm, 在 50  $\mu\text{L}$  PCR 产物中加入 8  $\mu\text{L}$  6  $\times$  loading buffer 混匀, 取 10  $\mu\text{L}$  混合样加入胶的加样孔中, 在 1  $\times$  TAE 电泳液中电泳, 电泳温度为 60  $^{\circ}\text{C}$ 。然后优化扩增产物电泳的电压和时间, 最终根据条带的分离效果确定出 DGGE 的最佳电泳条件。

## 2 结果与分析

### 2.1 PCR 扩增产物

四对引物扩大大曲的扩增产物的长度都在 400 ~ 600 bp 之间, 与目的片段的长度相符(图 1)。理论上对于 400 ~ 500 bp 的片段应该采用 6% 的聚丙烯酰胺胶, 但由于实际操作中发现, 6% 的胶易碎, 不易进行后续处理, 因此选用 8% 的聚丙烯酰胺胶。

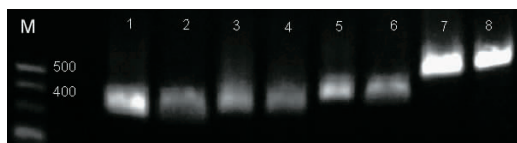


图 1 大曲真核微生物 18S rDNA PCR 扩增结果

M: DL500TM DNA Marker; 1 - 2: 引物 FF390, FR1 - GC 扩增产物; 3 - 4: 引物 EF4, NS - GC 扩增产物; 5 - 6: 引物 nu0817, nu1196 - GC 扩增产物; 7 - 8: 引物 Fung5, EF4 - GC 扩增产物; 1, 3, 5, 7 为中高温大曲; 2, 4, 6, 8 为高温大曲。

### 2.2 不同电压和时间条件下的电泳图谱

将引物 nu0817, nu1196 - GC 的扩增产物作为参考, 分别用不同电压和时间来对电泳条件进行优化, 获得的 DGGE 图谱如图 2 所示, 其中的 A、B、C、D 分别为不同电泳条件下的电泳泳道。A1、A2 采用的电泳条件为 200 V 电泳 5 h; B1、B2 为先用 200 V 电泳 4 min, 再用 130 V 电泳 14 h; C1、C2 条件为先用 200 V 电泳 4 min, 再用 100 V 电泳 15 h; D1、D2 条件为先用 200 V 电泳 4 min, 再用 90 V 电泳 16 h。结果发现, 不同电泳条件对大曲微生物的分离效果影响很大, 当电压为 200 V 时, 条带分离效果较差; 当电压为 90 V 和 100 V 时, 电泳时间太长, 达不到快捷的检测目的, 而且部分条带在胶下方分离效果较差; 本试验最终确定的电泳优化条件为: 先用 200 V 电泳 4 min, 再用 130 V 电泳 14 h, 在该条件下, 电泳条带较多而且清晰度高。



图 2 DGGE 条件优化图谱

A1 - A2: 200V, 5h; B1 - B2: 130V, 14h;  
C1 - C2: 100V, 15h; D1 - D2: 90V, 16h

### 2.3 四对引物扩增产物的 DGGE 图谱

本试验采用四对近年来常用的真核微生物引物分别扩增中高温大曲和高温大曲微生物的 18SrDNA, 然后按照优化后的电泳条件对 PCR 产物进行电泳分析, 从图 3 可以看出, 每个泳道上的条带都在 10 - 25 之间, 不同的引物扩大大曲真核微生物 DNA 所得的 DGGE 图谱差异较大, 引物 FF390, FR1 - GC 和引物 nu0817, nu1196 - GC 获得的条带相对较多, 说明这两种引物更加适合扩大大曲微生物的 18SrDNA, 所得的图谱能够更好的反应大曲中真核微生物的种类以及其多样性, 通过图谱可以看出, 引物 FF390, FR1 - GC 和引物 nu0817, nu1196 - GC 扩增产物所得的电泳图上, 中高温大曲中真核生

物的种类比高温大曲真核微生物的种类要丰富一些。引物 EF4, NS - GC 和 Fung5, DGEF4 扩增产物在电泳图上的条带较少,所反映的信息不及前面两种引物,但用这两种引物所得的电泳图谱上,中高温大曲中真核微生物的种类仍然比高温大曲真核微生物的种类要丰富。通过对 DGGE 图谱的分析可知,引物 FF390, FR1 - GC 和引物 nu0817, nu1196 - GC 更适合用来研究大曲样品中的真核微生物群落结构。

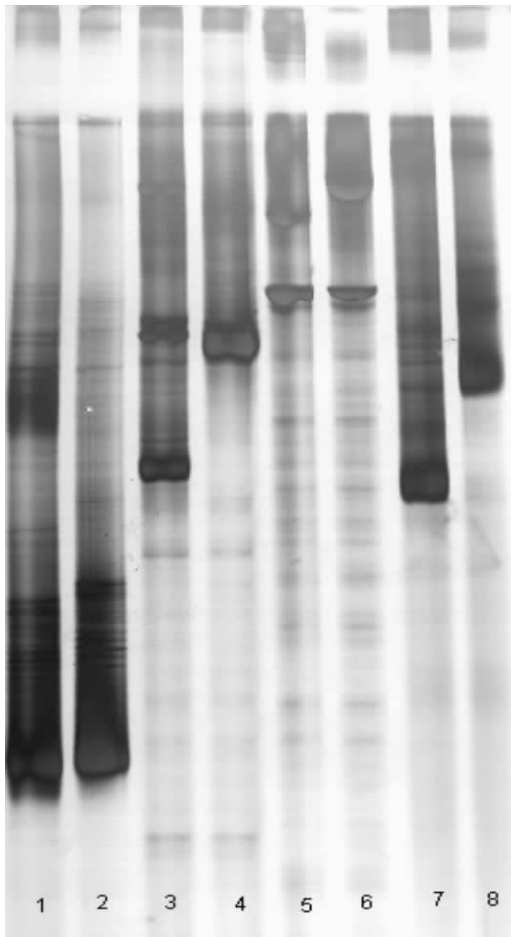


图3 四对引物 PCR 扩增产物的 DGGE 图谱

1,2 - 引物 FF390, FR1 - GC 扩增产物;3,4 - 引物 EF4, NS - GC 扩增产物;5,6 - 引物 nu0817, nu1196 - GC 扩增产物;7,8 - 引物 Fung5, EF4 - GC 扩增产物;1,3,5,7 为中高温大曲样;2,4,6,8 为高温大曲样。

### 3 讨论

PCR - DGGE 技术的分离效果在一定程度上依赖于引物的选择,所以真核微生物引物的选择显得尤为重要,首先,通过引物扩增出来的序列必须具有高度的种内保守性。此外,引物必须仅能特异性扩增出所有真核微生物种类,而不得扩增植物,其他微生物等非真核微生物模板,只有这样才能在 DGGE 图谱上真实反映出样

品中真核微生物的相关信息。Vainio EJ<sup>[6]</sup> 利用引物 FF390, FR1 对木材寄生真核微生物进行扩增,其 PCR 产物 DGGE 得到了较好的分离。范晓旭<sup>[8]</sup> 利用引物 nu0817, nu1196 - GC 扩增樟子松有机凋落物层的真核微生物,其 PCR 产物 DGGE 也得到了较好的分离,这两种引物的特异性较好。本试验中采用的四对不同的真核微生物引物来对大曲 DNA 样品进行 PCR 扩增,引物 Fung5, EF4 - GC 扩增产物 DNA 序列为 600bp,分离条带较少,可能是序列超过 500bp 从而导致检出率下降;其他三对引物扩增产物 DNA 序列为 400 - 500bp,与报道的 DGGE 的最佳 DNA 片段长度 400 - 500bp 相符<sup>[10]</sup>,分离的条带相对较多。对于凝胶上的特异性较好的 DNA 条带,可以用无菌刀进行切割回收,PCR 扩增后测序。通过 Blast 软件,将获得的序列与 GenBank 进行比对,并下载与其最相近的序列,用 phylip 软件构建系统进化树,通过 RDP 数据库<sup>[11]</sup>,可寻找到最相近的种属。

本试验利用 PCR - DGGE 技术为大曲真核微生物群落的研究提供更为科学的研究方法。此前,有关于浓香型大曲真核微生物 PCR - SSCP 的研究报道<sup>[12]</sup>,但所获得的条带较少,不一定完全反映大曲中真核微生物群落的相关信息。相比之下,本试验采用 PCR - DGGE 技术获得的图谱上条带较多,能够更真实地反映大曲中真核微生物种群的多样性。从本试验的电泳图谱中,大曲中的真核微生物菌群有 10 ~ 25 种,这说明本试验中选取的引物以及优化出的 DGGE 电泳条件,适用于大曲真核微生物的研究,并具有很好的分离效果。通过本研究能很好地将高温大曲中的优势真核微生物菌群分离出来,同时本方法有较好的重现性,可以更好的为后续条带回收和测序服务。

### 参考文献:

- [1] 乔宗伟,张文学,张丽莺,等.浓香型白酒发酵过程中酒醅的微生物区系分析[J].酿酒,2005,32(1):18-22.
- [2] 余有贵,杨志龙,罗俊,等.中国传统白酒生产用酶的研究动态[J].酿酒科技,2006(9):74-77.
- [3] 潘勤春,孟镇,钟其顶,等.分子生态学技术在大曲微生物群落研究中的应用前景初探[J].酿酒科技,2011,21(3):87-89.
- [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,1996(3):19-21.
- [5] 张洪勋,晓谊,齐鸿雁.微生物学研究方法进展[J].生态学报,2003,23(5):988-995.

- [6] Vainio EJ, Hantula J. Direct analysis of wood-inhabiting fungi using denaturing gradient gel electrophoresis of amplified ribosomal DNA[J]. *Mycology Research*, 2000, 104(8):927-936.
- [7] Eric Smit, Paula Leef Lang, Boet Glandorf. Analysis of Fungal Diversity in the Wheat Rhizosphere by Sequencing of Cloned PCR-Amplified Genes Encoding 18S rRNA and Temperature Gradient Gel Electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, 65(6): 2614-2621.
- [8] 范晓旭. 利用 PCR-DGGE 法对樟子松有机凋落物层真菌多样性及高频菌株酶活研究[D]. 哈尔滨: 黑龙江大学, 2010.
- [9] 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*, 2009, 22(4):72-74.
- [10] 高启禹, 徐光翠, 李小英. 变性梯度凝胶电泳(DGGE)在微生物多样性中的研究[J]. *生物学杂志*, 2009, 26(5):80-82.
- [11] 翟祖欢. PCR-DGGE 在真菌群落研究中的应用解析[J]. *齐齐哈尔大学学报*, 2010, 26(3):57-59.
- [12] 罗惠波, 黄治国, 李浩, 等. 浓香型大曲真核微生物群落的 PCR-SSCP 解析[J]. *中国酿造*, 2009(8):42-44.

## Optimization of PCR-DGGE Electrophoresis Conditions of Eucaryotic Microorganisms Community in Daqu

LUO Hui-bo, HOU Hai-bo, HUANG Zhi-guo, WEI Chun-hui, YE Guang-bin

(Liquor-making Biotechnology & Application key Laboratory of Sichuan province, Sichuan University of Science & Engineering, Zigong 643000, China)

**Abstract:** DGGE was applied to eukaryotic microbes community of Daqu in the experiment. DGGE electrophoresis conditions for 18S rDNA of eukaryotic microbes were optimized as follows: Gel concentration was 8%, denatured range was between 40% ~ 70%, electrophoresis ran 4 minutes at first as the voltage was 200V and then ran for 14 hours as the voltage was 130V. Under these conditions, satisfactory separation results could be achieved by electrophoresis.

**Key words:** Daqu; eukaryotic microbes; PCR-DGGE