

酒醅微生物 DNA 提取预处理方法研究

沈才萍¹, 李德林², 沈才洪^{1,3}, 邓波^{1,3}, 沈小娟^{1,3}, 敖宗华^{1,2,3}

(1. 泸州老窖股份有限公司, 四川 泸州 646000; 2. 四川理工学院生物工程学院, 四川 自贡 643000;
3. 国家固态酿造工程技术研究中心, 四川 泸州 646000)

摘要:浓香型白酒的酒醅中含有大量的单糖、寡糖、多糖、色素、有机酸和腐殖酸等有机杂质,严重影响对酒醅中微生物进行相关分子生物学研究。如何通过预处理方法降低杂质的影响,快速成功提取高质量的 DNA 直接影响整个分子生物学实验的准确性。实验采用无菌水、TENP 缓冲液、PBS 缓冲液分别对酒醅样品进行预处理。通过对样品浓度、纯度、DGGE 丰度等指标的比较,确定了 PBS 预处理法为最佳预处理方法。

关键词:浓香型白酒;酒醅;预处理

中图分类号:Q331

文献标志码:A

引言

运用分子生物学相关方法对固态酿造食品中微生物进行分子生态分析。不仅能克服经典培养方法对微生物群落结构特征信息研究丢失的局限,还可以更加可靠、快速地获得发酵过程中各种微生物的菌落指纹特征,确定微生物的多样性及其分类地位。对食品发酵进行微生物分子生态研究,首先是需要获得高质量微生物总 DNA。所以,发酵食品微生物总 DNA 提取是进行后续分子生物学研究的第一个技术难点。能否快速成功获得样品的总 DNA,获得的总 DNA 质量的高低直接影响整个后续实验的成败^[1]。在富含多糖、盐、淀粉、腐殖酸和代谢色素酚等杂质的酒醅环境中提取微生物总 DNA,这些杂质不易与 DNA 样品分离,而它们的存在会抑制 DNA 聚合酶活性,导致后续分子生物学实验失败。

环境样品总 DNA 预处理方法可概括为两类:直接法和间接法,直接法是先用水溶解样品中的杂质,通过反复离心等方法获得样品沉淀,该操作能除去环境样

品中水溶性杂质,还能减少微生物在预处理中的丢失;间接法提取是通过梯度离心、离心洗涤等步骤出去样品杂质,然后再收集菌体,该过程容易造成微生物种类和数量的丢失,但能够得到较高质量的 DNA。根据环境样品的差异采用合适的预处理方法,能够保证实验的顺利进行。在此,本实验研究了不同预处理方法,以获得一种适合酒醅环境中微生物总 DNA 提取预处理的方法。

1 材料与方法

1.1 实验材料

酒醅样品采集于泸州老窖罗汉基地浓香型白酒窖池。取样后迅速置于 -80 °C 冰箱保藏,备用。

1.2 主要试剂与仪器

试剂:蛋白酶 k (上海生工生物工程技术有限公司)、无菌水、TENP 缓冲液、PBS 缓冲液。

仪器:PCR 仪(美国 BIORAD)、DGGE 电泳仪(美国 BIORAD)、高速离心机(日本 HITACHI)、核酸蛋白检测仪(德国 Eppendorf)。

收稿日期:2013-04-05

基金项目:四川省科技支撑计划项目(2011FJ0004;2012FZ0068)

作者简介:沈才萍(1967-),女,四川泸县人,高级工程师,主要从事浓香型白酒生产管理及相关方面的研究,(E-mail)573273728@qq.com

1.3 酒醅预处理

称取 0.5 g 酒醅样品于 50 mL 离心管,分别按照下面方法进行。

方法 A(无菌水):离心管加入 3 mL 无菌水和 0.3 g 玻璃珠,漩涡震荡 5 min,10 000 rpm 离心 5 min,弃上清。在沉淀中加入 3 mL 无菌水重复上述操作 2 次,取沉淀。

方法 B(TENP):离心管加入 3 mL TENP 缓冲液和 0.3 g 玻璃珠,漩涡震荡 5 min,10 000 rpm 离心 5 min,弃上清。在沉淀中加入 3 mL TENP 缓冲液重复上述操作 2 次,取沉淀。

方法 C(PBS):离心管加入 3 mL PBS 缓冲液和 0.3 g 玻璃珠,漩涡震荡 5 min,200 × g 离心 5 min,吸取上清液。在沉淀中加入 3 mL PBS 缓冲液重复洗涤两次,合并三次上清液,12 000 rpm 离心 5 min,取沉淀。

1.4 DNA 的提取和纯化^[2]

预处理后的沉淀中加入 1 mL DNA 抽提液(100 mmol/L Tris - HCl pH8.0, 100 mmol/L EDTA, 100 mmol/L Na₃PO₄, 1.5 mol/L NaCl)和 5 μg 蛋白酶 k(20 mg/mL),200 r/min 摇床 37 °C 下 30 min,在加入 500 μL 10% SDS 65 °C 水浴 1 h。水浴后的样品 4 °C 下 6000 × g 离心 10 min,小心吸取上清于 2 mL 离心管,加入等体积酚氯仿异戊醇(25:24:1)抽提一次,12 000 rpm 离心 10 min,取上清加入等体积氯仿异戊醇(24:1)12 000 rpm 离心 10 min,取上清,重复两次。上清液加入 0.6 体积预冷的异丙醇 -20 °C 沉淀 1 h,12 000 rpm 离心 10 min,小心倒掉液体。沉淀用 70% 乙醇洗涤数次。洗涤后的 DNA 用吹风吹干后 TE 溶解, -20 °C 保存。

1.5 DNA 核酸蛋白仪检测

提取的 DNA 样品在核酸蛋白仪中测其 OD₂₃₀、OD₂₆₀、OD₂₈₀、OD₃₄₀ 及 OD_{260/280}、OD_{260/230}。

1.6 细菌 v3 区 PCR

(1)引物:16S rDNA V3 区 PCR 扩增所用的引物采用 Muzyer 等人所用的引物,可以扩增 16S rDNA V3 区约 196bp 的片段,对应 E. coli 16S rDNA 341 到 534 的位点。在片段的一端加了富含 GC 的片段(GC clamp),序列如下:

P2:5' - ATT ACC GCG GCT GCT GG - 3'

P3:5' - [CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG G] CCT ACG GGA GGC AGC AG - 3'

(2)PCR 反应体系及程序:PCR 反应需进行两轮,第一轮反应体系为 25 μL:0.2 μL Taq 酶(5 u/μL),2 μL dNTPs(2.5 mM),2.5 μL 10 × buffer,引物(10 pM)各 1 μL,模板 DNA(10 ng),18.3 μL 灭菌双蒸水。程序:94 °C 预变性 4 min;94 °C 变性 1 min,应用降落 PCR,65 °C 开始退火,每两轮降低 1 °C,最终降至 56 °C,退火 1 min,72 °C 延伸 1 min;再 94 °C 变性 1 min,55 °C 退火 1 min,72 °C 延伸 1 min,共 10 个循环,72 °C 终延伸 6 min。第二轮 PCR 反应(50 μL):0.5 μL Taq 酶(5 u/μL),4 μL dNTPs(2.5 mM),5 μL 10 × buffer,引物(10 pM)各 1 μL,第一轮 PCR 产物模板 DNA(5 μL),33.5 μL 灭菌双蒸水,94 °C 预变性 3 min,94 °C 变性 1 min,55 °C 退火 1 min,72 °C 延伸 1 min,共 10 个循环,终延伸 72 °C 10 min。两轮 PCR 产物用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳分离检验,电压约 11 V/cm,电泳时间 20 min,凝胶成像系统照相。

1.7 DGGE 电泳

DGGE 电泳条件:8% 聚丙烯酰胺凝胶,DGGE 采用 30% ~ 50% 变性梯度(100% 变性剂浓度为 7 M 尿素,40% 甲酰胺),上样量为 80 uL 的 PCR 产物。电泳缓冲液为 1 × TAE,60 °C,200 V 电压电泳 3.5 h,SYBR Green I 染色 45 min,凝胶成像系统拍照。

2 结果与分析

2.1 核酸蛋白仪检测结果分析

蛋白核酸定量检测仪测定三种方法所提总 DNA 在 280 nm、260 nm 与 230 nm 下光吸收值,并以 A₂₆₀/A₂₈₀ 与 A₂₆₀/A₂₃₀ 分析 DNA 纯度,根据 DNA 浓度换算出每克酒醅样品中 DNA 含量。每种方法重复 4 次独立实验(n=4),DNA 浓度与 DNA 提取量以 4 次重复试验的 $\bar{x} \pm s$ 表示。P ≤ 0.01 表示具有显著差异。实验数据用 STATA 统计软件分析完成。结果见表 1。

表 1 不同预处理方法提取 DNA 比较

方法	A 260/280	A 260/230	A 340	DNA 提取率(μg/g)
无菌水处理	1.645 ± 0.045	1.195 ± 0.040	0.223 ± 0.051	19.145 ± 0.561
TENP 处理	1.535 ± 0.047	0.823 ± 0.093	0.170 ± 0.009	11.295 ± 1.920
PBS 处理	1.855 ± 0.024	1.430 ± 0.059	0.107 ± 0.021	13.275 ± 0.844

注:所有数据 p > 0.01 说明结果均无显著差异

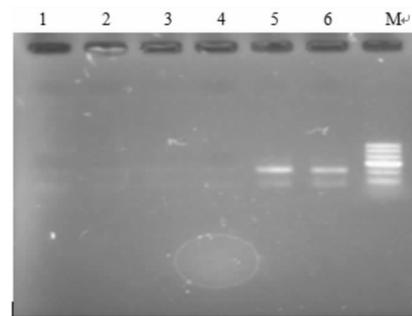
从表1结果可以看出三种预处理方法均得到较高浓度的DNA,其中无菌水处理的样品平均值达到 $95.725 \pm 2.804 \mu\text{g/mL}$,其次是PBS处理样品平均值为 $66.375 \pm 4.224 \mu\text{g/mL}$,浓度最低为TENP处理样,其平均值为 $56.475 \pm 9.601 \mu\text{g/mL}$ 。从获得DNA浓度分析,无菌水处理样品明显高于其余两种方法,而PBS缓冲液和TENP缓冲液处理样DNA浓度差别不大。其原因可能由于TENP中的PVP与酒醅中的腐殖酸、酚类物质结合的时候,少量DNA分子也结合在一起,留在上清液中,造成DNA的损失。PBS处理是通过多次悬浮细胞来获得菌体,由于少量细菌与酒醅结合在一起,振荡后少量菌体仍留在酒醅中而损失。

DNA的纯度可通过A260/A280比值表示,比值在1.8~2.0说明DNA纯度较好,比值低于1.8说明样品DNA存在蛋白质污染,比值高于2.0说明样品存在RNA污染。样品杂质的含量可以通过A260/A230比值来确定,即比值越高,杂质含量越低。无菌水、TENP、PBS三种预处理方法获得的DNA样品A260/A280平均值分别为 1.645 ± 0.045 、 1.535 ± 0.047 和 1.855 ± 0.024 。其中无菌水和TENP处理样低于1.8,说明样品中存在蛋白质污染。无菌水处理样品虽然DNA浓度较高,但各种杂质含量也是最高的,反映出DNA浓度越高其杂质含量也就越多,原因可能是杂质与DNA分子之间存在相互结合,其机理还未见相关报道,有待进一步研究。TENP缓冲液中的PVP可以和苯酚基化合物形成氢键,国内外大部分方法也应用PVP或是不溶性的聚乙烯吡咯烷酮去除腐殖酸^[3-4]。从数据中可以看出用TENP处理样品OD A340较低,说明TENP对去除样品中的酚、腐殖酸有一定的效果。经过PBS处理的样品,经过高速离心后,大量杂质都沉淀下来,从而获得较纯净的菌液悬浮。

2.2 PCR扩增分析

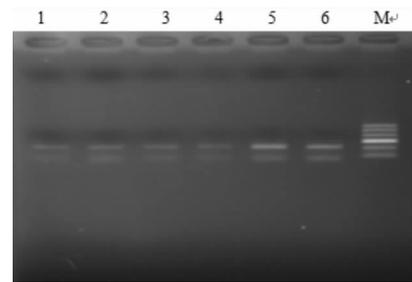
图1为第一轮PCR产物电泳图,图2为以第一轮PCR扩增产物为模板电泳图,三种预处理方法均在预测大小片段200 bp处有目的条带,扩增片段越清晰,条带越明亮,扩增出目的DNA浓度越高。无菌水与TENP处理的样品条带较暗,PBS处理后的样品,均有较亮条带,说明PBS方法能较好的扩增出目的基因。

DNA模板中腐殖酸的存在,可以螯合 Mg^{2+} 也可与DNA、蛋白质发生共价结合,从而抑制Taq酶的活性^[5]。



1,2 无菌水处理样;3,4 TENP处理样;
5,6 PBS处理样;M DNA maker。

图1 第一轮PCR琼脂糖电泳



1,2 无菌水处理样;3,4 TENP处理样;
5,6 PBS处理样;M DNA maker。

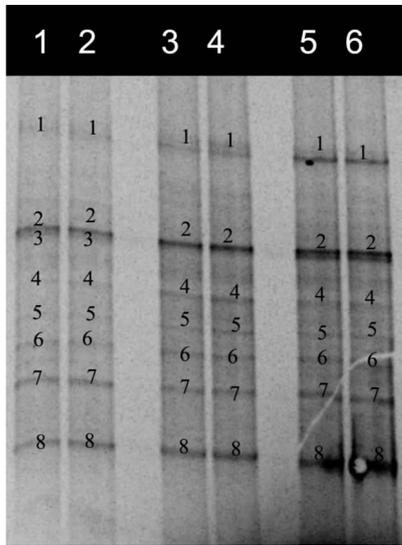
图2 第二轮PCR琼脂糖电泳

模板中蛋白质存在会阻碍引物与模板的结合,影响PCR扩增。无菌水样品虽然DNA浓度较高,但杂质含量也高,从图1、图2看出,杂质较高的无菌水和TENP处理的样品,其扩增目的DNA条带较暗,证明了DNA模板中杂质会影响PCR扩增。PBS处理样品中DNA浓度不高,但杂质含量较低,其扩增条带明亮,能很好的扩增目的基因片段,说明经过该方法处理后获得的酒醅微生物DNA,适合进行后续的操作。

2.3 V3区扩增片段DGGE分析

PCR-DGGE用于微生物群落结构的分析,一般要求目的片段在500 bp以下,对细菌群落的分析通常采用16S rRNA V3区片段^[6-7]。根据DGGE能分离长度相同而序列不同DNA的原理,图谱中不同条带代表不同的细菌,电泳条带越多表明分离的细菌种属越多,条带亮度越强表示该条带代表的相应细菌数量越多^[8-9]。三种预处理方法获得的DGGE图谱(图3)中条带的位置和数目均有差异,有的条带位置相同但亮度(粗细)不同,对应其在DGGE梯度胶上的密度大小不同,有的条带在DGGE梯度胶上出现的位置不一样,有的则显示空缺。无菌水处理的样品有五条明显条带且条带亮度较暗,TENP和PBS处理样品获得的DGGE图谱具有相近的条

带数、条带位置及相对丰度,表明两种方法获得的基因组 DNA 中菌群结构相似性较高。图像图谱分析表明 PBS 处理方法侦测条带最高(Int 值最高),TENP 处理方法次之,无菌水处理方法条带最少。将三种方法处理的样品获得的相同优势条带进行峰面积积分(表 2)。其中 PBS 处理方法获得的各条带清晰度最高。



1,2 无菌水处理样;3,4 TENP 处理样;
5,6 PBS 处理样。

图 3 细菌 16SrDNA V3 区扩增片段 DGGE 图谱

表 2 细菌 16SrDNA V3 区扩增片段 DGGE 指纹图谱
峰面积积分

	1	2	3	4	5	6
Band1	61.93	81.96	48.76	44.55	37.62	35
Band2	85.14	82.62	ND	ND	ND	ND
Band3	74.21	93.93	74.65	68.93	55.83	55.07
Band4	53.76	57.59	ND	ND	ND	ND
Band5	54.28	56.62	55.93	47.76	47.62	46.38
Band6	64	61.72	55.38	50.76	41.24	39.31
Band7	65.41	68.48	56.69	50.11	38.86	35.83
Band8	92.96	88	68.41	57.89	38.45	33.89

注:ND 为 NotDetected

3 讨论

本实验在三种预处理方法基础上,采用 SDS 高盐 + 蛋白酶 K 的方法提取得到酒醅中的微生物总 DNA。实验分析发现,DNA 样品中的杂质会严重影响 PCR 扩增,且 DNA 中杂质含量与 DNA 浓度成正相关,DNA 浓度越高其杂质含量也高。无菌水和 TENP 处理的样品在 PCR 第一轮和第二轮中扩增出条带较暗,最终 DGGE 图谱条带数目与亮度也较差。PBS 处理的样品能很好的扩增出目的基因,DGGE 图谱分析及相似性分析均表明 PBS

处理方法较佳,通过 PBS 处理方法获得的基因组 DNA 其 DGGE 图谱中条带明亮、丰度高,能很好反映样品细菌的多样性,有利于相关分子生物学分析。

分子生物学广泛应用于酒醅微生物生态学研究[10],如用于构建环境微生物基因库,用于动态分析群落变化规律以及微生物酿酒环境关系研究等。如何快速高效提取适于进一步分子生物学操作的微生物总 DNA 的方法成为关键技术。对酒醅样品进行预先处理,是一种简单有效的方法,能有效地去除大量杂质,保证后续分子生物学实验的顺利进行。本文比较了三种不同预处理方法,最终确定了 PBS 处理法为酒糟最佳预处理方法,可用于酒醅环境中细菌基因组 DNA 的提取。

参考文献:

- [1] 杨模华,李志辉.马尾松针叶 DNA 提取方法研究[J].中南林业科技大学学报,2008(3):39-44.
- [2] 倪峥飞,许伟,窦文芳.镇江香醋固态发酵醋醅中微生物总 DNA 提取方法比较[J].微生物学报,2010(1):119-125.
- [3] Muyzer G, Waal E, Uitterlinden A. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gelelectrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1993, 59:695-700.
- [4] Berthelet M, Whyte L, Greer C W. Rapid direct extra of DNA from soils for PCR analysis using polyvinylpyrrolidone columns[J]. FEMS Microbiol Lett, 1996, 138:17-22.
- [5] Zhou J, Bruns M, Tiedje A. DNA recovery from soils of diverse composition. Appl Environ Microbiol[J]. 1996, 62:316-322.
- [6] 李钧敏,金则新.一种高效可直接用于 PCR 分析的土壤总微生物 DNA 抽提方法[J].应用生态学报, 2006(11):2107-2111.
- [7] 文亚峰,何刚.枣叶片 DNA 的提取以及 AFLP 反应体系的建立[J].中南林业科技大学学报,2007(3):25-28.
- [8] 常月梅.核桃总 DNA 提取方法研究[J].经济林研究, 2006(3):38-39.

- [9] 魏勇,王红宁.PCR-DGGE 技术用于猪场沼气池细菌群落分析的条件优化[J].农业环境科学学报, 2011(3):599-604.
- [10] 卫春会,黄治国,甄攀.窖泥微生物群落 SSCP 分析条件优化的研究[J].四川理工学院学报:自然科学版,2010,23(6):695-698.

Pretreatment Method Study of DNA Extraction from Fermented Grains Microbial

SHEN Cai-ping^{1,2}, LI De-lin^{1,2}, SHEN Cai-hong^{2,3}, DENG Bo^{2,3}, SHEN Xiao-juan^{2,3}, AO Zong-hua^{1,2,3}

(1. Luzhou Laojiao Co., Ltd., Luzhou 646000, China; 2. School of Biotechnology Engineering, Sichuan University of Science & Engineering, Zigong 643000, China; 3. National Solid Brewing Engineering Technology Research Center, Luzhou 646000, China)

Abstract: The fermented grains of Luzhou-flavor liquor contain a lot of organic impurities, such as monosaccharide, oligosaccharide, polysaccharide, pigment, organic acid, humic acid, etc. These impurities seriously affect molecular biology research on the microorganism in fermented grains. How to reduce the impurities influence, and to quickly and successfully extract DNA of high quality through the pretreatment method, will directly affect the accuracy of the whole experiment. In order to solve this problem, this research use Sterile water, TENP buffer and PBS buffer, to deal with the samples. Through the index comparison of sample concentration, purity, DGGE abundance and so on, PBS method is determined to be the best pretreatment method.

Key words: luzhou-flavor liquor; fermented grains; pretreatment