

PCR-DGGE 技术及其在食品行业中的应用

梁慧珍¹, 崔丽华², 张春辉³, 赵树欣³

(1.天津天士力集团有限公司食品研究所,天津 300410;2.北京师范大学图书馆,北京 100875;
3.天津科技大学生物工程学院,天津 300457)

摘要: 现代分子生物学技术 PCR-DGGE 是一种分析微生物群落的有效工具,可以用于研究生态系统中微生物多样性和群落动态性。简要介绍了 PCR-DGGE 技术原理及其在食品行业中微生物生态学领域的应用。

关键词: PCR-DGGE; 微生物群落动态性; 食品行业; 应用

中图分类号:Q93-3;O65

文献标识码:B

文章编号:1001-9286(2008)10-0089-03

PCR -DGGE & Its Application in Food Industry

LIANG Hui-zhen¹, CUI Li-hua², ZHANG Chun-hui³ and ZHAO Shu-xin³

(1. Food Research Institute of TASLY Group Co. Ltd, Tianjin 300410; 2. Library of Beijing normal University, Beijing 100875;
3. College of Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: As a modern molecular biology technique, PCR-DGGE is a powerful tool for the analysis of microbial populations, which could be used to study the diversity and dynamics of microbial populations. The technical principles of PCR-DGGE and its application in food industry (microbial ecology) were introduced briefly in this paper.

Key words: PCR-DGGE; microbial population dynamics; food industry; application

1 PCR-DGGE 技术概况及原理

变性梯度凝胶电泳 (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, DGGE)最早是由 Fisher 和 Lerman^[1]于 1979 年发明并用于检测 DNA 突变的技术,1993 年 Mulyzer^[2]首次将该技术用于微生物生态学的研究,并证实了这种技术在研究自然界微生物群落的遗传多样性和种群差异方面具有明显的优越性。在近十年的时间已被广泛应用于各种环境微生物生态的研究,如高温热泉^[3]、湖泊^[4]、长江^[5]、海洋^[6]、根系^[7]、土壤^[8]和沙丘^[9]等。

DGGE 技术检测核酸序列是通过不同序列的 DNA 片段在各自相应的变性剂浓度下变性,发生空间构型的变化,导致电泳速度的急剧下降,最后在其相应的变性剂梯度位置停滞,经过染色后可以在凝胶上呈现为分散的条带。该技术可以分辨具有相同大小片段的序列差异,可以用于检测单一碱基的变化、微生物群落遗传多样性以及 PCR 扩增 DNA 片段的多态性。

2 PCR-DGGE 技术的特点

2.1 检测极限低

Mulyzer^[2]等用这种方法能检测出数量仅占总群落数 1% 的微生物。Omar 等证实 PCR-DGGE 技术检测极限为 1%~3%,如果结合使用 rRNA 杂交技术,还可使检

测极限降至 0.1% 左右。

2.2 检测速度快、经济

Omar 等利用该方法实时实地的研究了墨西哥发酵玉米面团 Pozoi 在发酵过程中不同阶段微生物种类和数量发生的动态变化。Cocofin 等^[10]对意大利香肠发酵动力学变化进行了研究,PCR-DGGE 法能在取样后 8 h 内得到结果,因此可以根据生产的实际需要工艺作出调整。

2.3 结果比较客观

传统的生化鉴定方法虽然也能对细菌进行鉴定,但会出现假阳性或假阴性结果,主观性比较强,而且会漏失一些不能培养的微生物。而 PCR-DGGE 方法则能客观完整地鉴定微生物,结果也很直观,它根据参考菌株和样品微生物 16S rDNA 的 PCR 扩增产物在凝胶中的相对位置来进行判断。若将凝胶上的条带切割下来测序,然后与 Genebank 中的标准序列进行比较分析,就可以得出它们的遗传相关性。

2.4 可同时检测多种微生物,分析多个样品

DGGE 凝胶上至少可以区分 10 个清晰可辨的条带,每个条带可能来自不同的微生物。并且可以同时分析多个样品。

2.5 能与其他多种方法结合

收稿日期:2008-07-03

作者简介:梁慧珍(1968-),女,山东人,硕士,高工,主要从事食品工业微生物的研究。

PCR-DGGE 在不同种群的初步调查以及优势群落的鉴定中是非常有用的,能够提供有关群体变化和差异的信息。DGGE 可以和许多方法结合,从而全面认识生态的组成、优势菌群等。实际上,这种结合起来的方法目前被认为是研究微生物真正的系统发育的最有力的手段,近些年来,这一观点得到了强调和重视。PCR-DGGE 可以和传统方法、糖和发酵产物分析、杂交技术、克隆测序技术、RAPD 技术等结合起来。

3 PCR-DGGE 在食品行业中的应用

近年来,国内外研究人员在食品行业中开始利用 PCR-DGGE 技术快速检测样品及其微生物动态的变化^[20]。

3.1 淀粉和面包发酵

1999年,Ampe等研究了墨西哥发酵玉米面团,直接从该面团中抽取微生物DNA并对16SrDNA的不同V3区PCR扩增,然后对通过DGGE得到纯化的DNA片段进行测序来鉴定乳杆菌^[11],他们还用同样的方法检测了酸化的木薯淀粉发酵中的微生物群落,检测到的微生物包括链球菌、乳球菌、乳杆菌、明串珠菌等。

Meroth等采用具有乳杆菌群特异性的16SrDNA引物,检测了不同面包发酵采用的酸面团,分析了各种面团的发酵中乳酸菌数量的变化,证明在整个发酵过程中占优势的菌类分别为旧金山乳杆菌、桥乳杆菌、约氏乳杆菌、路氏乳杆菌等^[12]。

3.2 牛奶和奶酪

Ercolini等用PCR-DGGE方法直接鉴定天然的乳清培养基(NWCs)中对Mozzarella奶酪生产起作用的微生物,对乳清培养基中16SrDNA的V3区进行PCR-DGGE分析,鉴定出德氏乳杆菌、乳球菌和嗜热链球菌等嗜温的乳酸菌和一些污染物。通过对Stilton奶酪中细菌群落16SrDNA的V3和V4-V5区进行序列分析,结果表明,传统的英国奶酪由植物乳杆菌、乳明串珠菌、马胃葡萄球菌、粪肠球菌和肠膜明串珠菌等复杂的菌群共同发酵生产。他们还用DGGE分离的序列设计出特殊的探针用于奶酪的FISH杂交荧光实验,检测到不同种类微生物的位置并且发现Stilton奶酪的中心、外壳下和沿奶酪纹理的微生物对发酵起着不同作用^[13]。

Randazzo等利用乳酸菌特殊的前体跨越VI-V3区,通过DGGE对16SrDNA的可变区V6-V8进行序列分析,鉴定了Artisanal Sicilian奶酪生产中总的微生物菌群,并将16SrRNA先进行反转录(RT-PCR)再进行DGGE,rDNA扩增片段的克隆和测序表明,在原料奶中嗜温细菌如明串珠菌、乳杆菌等占优势地位,而在发酵中嗜热链球菌占优势,成熟过程中还发现其他的乳杆

菌如发酵乳杆菌和德氏乳杆菌等^[14]。

3.3 啤酒和葡萄酒

Cocolin等用PCR-DGGE分析酵母DNA的26SrDNA可变区域的方法来监控酵母菌群,并且在实验室规模的葡萄酒发酵中对这种方法进行验证,鉴定出在发酵初期有假丝酵母存在,而发酵后期啤酒酵母成为优势微生物,改进后的方法可用于大规模葡萄酒发酵中酵母菌群的检测,对发酵各阶段酵母菌群指纹图谱的分析也表明对应于啤酒酵母的谱带占优势^[15]。

Mills等通过分析葡萄酒发酵中酵母的多样性,证明发酵温度对非啤酒酵母的生长有着重要影响。对PCR和RT-PCR中获得的26SrDNA片段DGGE分析的结果,发现在整个发酵过程中存在假丝酵母,而发酵过程结束时非啤酒酵母的含量降低,但对应于假丝酵母的谱带仍然存在。

3.4 发酵和非发酵型饮料

Van Beck和Prest对16SrDNA的V3区进行PCR-DGGE分析,对V6-V8区进行RT-PCR-DGGE分析,并将传统的分离方法染色计数和电子显微镜扫描相结合,检测到Malt威士忌中乳酸菌菌群在发酵中起重要作用,而同型发酵的嗜酸乳杆菌和卷曲乳杆菌在发酵后熟中起着重要作用^[16]。Dewettinek等比较了瓶装矿泉水样品的DGGE条带和样品平板培养的指纹图谱,得到了在矿泉水样品中菌类的百分比^[17]。

3.5 其他发酵食品

Cocolin等在自然发酵的意大利香肠分析中,采用16SrDNA的VI区进行PCR和RT-PCR获得扩增片段进行DGGE分离,在香肠成熟早期发现乳杆菌和微球菌和污染菌(热杀微杆菌和肠杆菌等),发现乳杆菌尤其是清酒乳杆菌和弯曲乳杆菌在发酵和蛋白水解中起着重要作用,决定了发酵香肠的感官特性^[18]。

Raling等研究了印度尼西亚香草加工中微生物菌群的变化,采用18SrDNA进行PCR-DGGE的方法鉴别了香草豆加工中的酵母和真菌,发现在香草豆生产的高温过程中有枯草杆菌菌群存在^[19]。

在国内研究人员进行了泡菜中乳酸菌多样性的研究,也进行了灵菇菌发酵的研究。

4 PCR-DGGE 指纹分析技术的应用前景

PCR-DGGE方法可用于检测食品中的的活泼微生物,通过对特异rDNA序列或目的基因的分析可以检测发酵过程中存在的微生物。PCR-DGGE技术可应用于微生物发酵研究和发酵食品风味和质构分析,例如对我国传统白酒发酵和中药材种质资源进行研究。这一技术还可用于检测某些名优食品中的微生物种类从而判断

其地理来源和产品质量。

参考文献:

- [1] Fischer S G, Lerman L S. DNA fragments differing by single basepair substitutions are separated in denaturing gradient gels: correspondence with melting theory[J]. Proceedings of the National Academy of Science of USA. 1983,80: 1579-1583.
- [2] Muyzer, G., Ellen, C.D. W, Andre, G.U. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction genes coding for 16S rRNA[J]. Applied and Environmental Microbiology. 1993,59: 695-700.
- [3] Ferris M J, Muyaer G, Ward D M. Denaturing gradient gel electrophoresis profiles of 16S rRNA-defined population inhabiting a hot spring microbial mat community[J]. Applied and Environmental Microbiology. 1996,62: 340-346.
- [4] Casamayor E O, Achafer H, Baneras L, et al. Identification of and spatiotemporal differences between microbial assemblages from two neighboring sulfurous lakes: comparison by microscopy and denaturing gradient gel electrophoresis[J]. Applied and Environmental Microbiology. 2000,66: 499-508.
- [5] Sekiguchi H, Watanabe M, Nakahara T, et al. Succession of bacterial community structure along the ChangJiang River determined by denaturing gradient gel electrophoresis and clone library analysis[J]. Applied and Environmental Microbiology. 2002,68: 5142-5150.
- [6] Bano N, Hollibaugh J T. Phylogenetic composition of bacterioplankton assemblage from the Arctic ocean[J]. Applied and Environmental Microbiology. 2002,68: 505-518.
- [7] Duineveld B M, Rosado A, Elsas J D, et al. Analysis of the dynamics of bacterial communities in the rhizosphere of the chrysanthemum via denaturing gradient gel electrophoresis and substrate utilization patterns[J]. Applied and Environmental Microbiology. 1998,64: 4950-4957.
- [8] Smit E, Leeflang P, Gommans S, et al. Diversity and seasonal fluctuations of the dominant members of the bacterial soil community in a wheat field as determined by cultivation and molecular methods[J]. Applied and Environmental Microbiology. 2001,67: 2284-2291.
- [9] Kowalchuk G A, Stephen J R, de Boer W, et al. Analysis of ammonia-oxidizing bacteria of the β -subdivision of the class proteobacteria in coastal sand dunes by denaturing gradient gel electrophoresis and sequencing of PCR-amplified 16S rDNA fragments[J]. Applied and Environmental Microbiology. 1997,63: 1489-1497.
- [10] Ampe F, Ben Omar, N Moizan, C Wachter, C Guyot J-P. Polyphasic study of the spatial distribution of microorganisms in Mexican pozol, a fermented maize dough, demonstrates the need for cultivation-independent methods to investigate traditional fermentations[J]. Appl Environ Microbiol 1999, 65: 5464-5473.
- [11] Meroth C B, Walter J, Hertel C, Brandt M J, Hammes W P. Monitoring the bacterial population dynamics in sourdough fermentation processes by using PCR-denaturing gradient gel electrophoresis[J]. Appl Environ Microbiol, 2003, 69: 475-482.
- [12] Ercolini D, Hill P J, Dodd C E R. Development of a fluorescence in situ hybridisation method for cheese using a 16S rRNA probe[J]. J Microbiol Methods, 2003, 52: 267-271.
- [13] Randazzo C L, Torriani S, Akkermans A J L, de Vos W M, Vaughan E E. Diversity, dynamics and activity of bacterial communities during production of an artisanal Sicilian cheese as evaluated by 16S rRNA analysis[J]. Appl Environ Microbiol, 2002, 68: 1882-1892.
- [14] Cocolin L, Bisson L F, Mills D A. Direct profiling of the yeast dynamics in wine fermentations[J]. FEMS Microbiol Lett, 2000, 189: 81-87.
- [15] Mills D A, Johannsen E A, Cocolin L. Yeast diversity and persistence in Botrytis-aerated wine fermentations [J]. Appl Environ Microbiol, 2002, 68: 4884-4893.
- [16] Van Beck S, Priest F G. Evolution of the lactic acid bacterial community during malt whisky fermentation: a polyphasic study. Appl Environ Microbiol, 2002, 68: 297-305.
- [17] Dewettinck T, Hulsbosch W, Van Hege K, Top E M, Verstraete W. Molecular fingerprinting of bacterial populations in groundwater and bottled mineral water [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2001, 57: 412-418.
- [18] Cocolin L, Manzano M, Cantoni C, Comi G. Denaturing gradient gel electrophoresis analysis of the 16S rRNA gene V1 region to monitor dynamic changes in the bacterial population during fermentation of Italian sausages [J]. Appl Environ Microbiol, 2001, 67: 5113-5121.
- [19] Raling W F M, Kerler J, Braster M, Apriyantono A, Stam H van Verseveld H W. Microorganisms with a taste for Vanilla: microbial ecology of traditional Indonesian Vanilla curing [J]. Appl Environ Microbiol, 2001, 67: 1995-2003.
- [20] 杨佐毅, 李理, 等. PCR-DGGE 指纹分析技术在微生物检测中的应用 [J]. 食品工业科技, 2006, (2): 201-203.

洋河两产品获表彰

本刊讯: 2008年9月中旬, 在中国食品工业协会白酒专业委员会发布的2007年度白酒骨干企业先进生产经营成果名单上, 江苏洋河酒厂股份有限公司2个产品获得表彰。其中, 天之蓝(52%vol)被评为年度酒体设计先进产品; 梦之蓝(42.8%vol)被评为年度质量效益先进产品。(江源)