

PCR-DGGE 技术在乳酸菌检测中的条件研究

马俊孝, 孔 健*

(山东大学 微生物技术国家重点实验室, 山东, 济南 250100)

摘 要: 变性梯度凝胶电泳技术广泛应用于微生物生态学的研究, 最近也渗透到食品微生物学领域。为了检测发酵乳制品中乳酸菌的组成及动态变化, 本实验对 PCR-DGGE 技术在乳酸菌检测中所需要的条件如变性剂梯度、电泳时间进行研究。结果表明, 变性剂梯度在 30%~55%, 电泳时间为 200min 时, 能够有效分离乳酸菌的 16S rRNA 基因的 V3 区域。在此基础上, 就 PCR 技术对染色体 DNA 混合模板的扩增效率进行分析, 结果发现, 常规 PCR 技术与降落 PCR 技术对乳酸菌 16S rRNA 基因 V3 区域的扩增没有差异, 而细菌通用引物对乳酸菌模板 DNA 的识别和扩增具有优先和偏爱性, 预示 PCR-DGGE 技术用于微生物群体检测时还应选用乳酸菌引物进行佐证。

关键词: 变性梯度凝胶电泳; 聚合酶链式反应; 乳酸菌; V3 可变区域

Study on Detection Conditions of Lactic Acid Bacteria by PCR-DGGE

MA Jun-xiao, KONG Jian*

(State Key Laboratory of Microbial Technology, Shandong University, Jinan 250100, China)

Abstract: Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) analysis was recently applied in the detection of food microbial diversities as well as of environmental microbial communities widely. To analyze the component and structure of lactic acid bacteria in food samples and dairy fermented products, DGGE conditions such as gradient of denaturant and run time for electrophoresis were firstly optimized. The results showed that 30%~55% was a suitable denaturant range of gradient for partially melting DNA fragments, and about 200 min was a proper time for the variable V3 region separation of 16S rRNA genes of lactic acid bacteria. Five chromosomes DNA mixture of lactic acid bacteria was used as template DNA for traditional PCR and touch down PCR to amplify the V3 region, respectively. The PCR production was subjected to DGGE analysis as described above. The different efficiencies of amplification during PCR by universal bacteria primer set were also observed. This suggested that the limit in the detection potential of PCR-DGGE is a consequence of DNA template competition during the amplification reaction.

Key words denaturing gradient gel electrophoresis; polymerase chain reaction; lactic acid bacteria; variable V3 region
中图分类号: Q939.97 文献标识码: A 文章编号: 1002-6630(2008)04-0225-05

变性梯度凝胶电泳(denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE)是一种不依赖于培养过程而对混合样品微生物组成进行检测和鉴定的分子生物学技术, 其理论依据是根据双链 DNA 分子碱基组成的差异, 在变性凝胶电泳时具有不同的解链温度而滞留于凝胶的不同位置, 形成相互分开的谱带^[1]。从理论上讲, 只要选择适宜的电泳条件如变性梯度、电泳时间等, 均可将大小相同、碱基组成不同的 DNA 片段分开^[1-2]。DGGE 技术对分离的靶基因长度具有一定的要求, 一般对 500bp 以下的基因片断分离效果较好^[3]。用于 DGGE 分析

的靶基因多为保守基因, 如 Rpo B、rpo B 基因^[4]。荷兰乳制品研究所学者 Klijn 等^[5]在比较乳球菌和明串珠菌的 16S rRNA 基因时发现, 在 16S rRNA 基因内部存在三个可变区域 V1、V2 和 V3, 16S rRNA 基因拷贝数高、基因剂量大, 在提取 DNA 中易于获得, 因此, V3 可变区域常被 DGGE 技术作为靶基因用于乳酸菌的检测和鉴定。

乳酸菌是一群兼性厌氧菌, 多分布于植物表面和动物肠道, 采用常规的微生物培养方法对其菌群的分离和鉴定往往不准确, 其原因是培养过程需要厌氧条件, 再者这类菌群生理生化特性非常相似, 仅凭这些特性不易

收稿日期: 2007-03-08

基金项目: 国家“863”高技术研究发展计划项目(2006AA10Z44)

作者简介: 马俊孝(1978-), 男, 硕士研究生, 研究方向为食品微生物学。E-mail: jx.m@mail.sdu.edu.cn

* 通讯作者: 孔健(1964-), 女, 教授, 研究方向为基础微生物学。E-mail: kongjian@sdu.edu.cn

区别。分子生物学技术的发展提高了乳酸菌混合样品中菌株分离和鉴定的效率和准确性, DGGE 技术用于乳酪、酸面团发酵的乳酸菌检测及菌群动态分析中已有成功报道^[6-9]。为了使 PCR-DGGE 技术更好地在乳制品发酵中应用和推广, 本实验对 PCR-DGGE 技术使用的相关参数如变性剂梯度、电泳时间等进行摸索, 并用细菌通用引物对扩增乳酸菌 V3 区域的常用 PCR 和降落 PCR 产物进行 DGGE 比较, 为 PCR-DGGE 技术快速检测和鉴定乳酸菌奠定基础。

1 材料与方法

1.1 菌株与培养基

干酪乳杆菌(*Lactobacillus casei*)、短小乳杆菌(*Lactobacillus brevis*)、德氏乳杆菌(*Lactobacillus delbrueckii*)、嗜热链球菌(*Streptococcus thermophilus*)、植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)、发酵乳杆菌(*Lactobacillus fermentum*)、乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*), 均为本实验室保藏菌种。乳杆菌培养在 MRS 培养基中, 乳球菌培养在 GM7 培养基中。

1.2 仪器

高速冷冻离心机 德国 Heraeus 公司; 变性梯度凝胶电泳仪(Dcode 突变分析系统) 美国 Bio-Rad 公司; 凝胶成像系统 Syngene 公司; 梯度热循环 PCR 基因扩增仪 德国 Eppendorf 公司; DNA 浓缩仪 德国 Thermo Savant 公司; 核酸定量仪 德国 Biophotometer 公司。

1.3 染色体 DNA 的提取

在提取乳酸菌染色体 DNA 之前, 收集的菌体细胞用 STE 缓冲液(0.1mol/L NaCl、10mmol/L Tris·Cl、1mmol/L EDTA, pH 8.0)洗涤后, 悬浮在含有 10mg/ml 的溶菌酶溶液中, 37℃ 酶解 2h, 收集原生质体, 然后按照 Niwa T 等^[10]所述方法提取染色体 DNA。

1.4 16S rDNA V3 区域的克隆

以提取的乳酸菌染色体 DNA 为模板, 利用细菌通用引物^[11]R518(5'-ATT ACC GCG GCT GCT GG-3')和 F357GC(5'-CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GCC TAC GGG AGG CAG CAG -3')对乳酸菌 16S rRNA 基因 V3 区域进行扩增。PCR 反应体系: 一定量的模板、3pmol 每种引物、200μmol/L dNTP、2μl 10×buffer(Mg²⁺ free)、1.5mol/L MgCl₂、1U rTaq 酶, 用适量的无菌重蒸水补足 20μl。94℃ 预变性 5min, 94℃ 变性 30s, 55℃ 退火 1min, 72℃ 延伸 2min, 25 个循环后, 72℃ 最终延伸 7min。

1.5 变性剂梯度的确定

变性剂梯度范围的确立采用垂直凝胶电泳, 即在制备 10% 聚丙烯酰胺变性凝胶时, 变性剂梯度分别为 0~80% 和 30%~50%(100% 的变性剂为 7mol/L 尿素、40%

甲酰胺), 其线性增加方向与电泳方向垂直。取 100μl 含有适量上样缓冲液的 PCR 产物, 加入预热凝胶板的加样孔中, 在 56℃、100V 电压下恒温电泳 200min。电泳结束后用溴化乙锭染色 30min, 使用紫外凝胶成像系统观察结果, 确定变性剂的梯度范围。

1.6 电泳时间的确定

电泳时间的确定采用水平凝胶电泳, 即根据上述垂直电泳结果, 制备变性剂呈线性梯度增加、其增加方向与电泳方向一致的 10% 聚丙烯酰胺凝胶。DNA 样品的加入采用时间间歇方法(time-travel), 即每隔一定时间加一次 DNA 样品于点样孔, 从而使样品的电泳时间有一个梯度, 在 60℃ 恒温下, 电压 100V 进行电泳, 电泳结束后溴化乙锭染色 30min, 紫外凝胶成像仪分析结果, 根据 PCR 产物电泳条带分离的情况确定最佳电泳时间。

1.7 细菌通用引物扩增 V3 区域效率的差异

分别以提取的乳酸菌染色体 DNA 单独作模板和染色体 DNA 等量混合后作模板, 利用细菌通用引物 R518 和 F357GC(序列见 1.4), 对 16S rRNA 的 V3 区域分别进行常规 PCR 和降落 PCR 扩增。PCR 反应体系同 1.4。降落 PCR 条件: 94℃ 预变性 5min, 94℃ 变性 30s, 65℃ 退火 1min, 72℃ 延伸 2min, 之后每个循环退火温度降低 1℃ 直至 55℃, 并在此退火温度下继续进行 20 个循环, 最终 72℃ 延伸 7min。进行常规 PCR 时, 退火温度为 55℃, 其余反应体系、条件与降落 PCR 相同。

2 结果与分析

2.1 变性剂梯度范围的确定

由于靶基因 DNA 碱基的组成差异, 在适宜变性剂梯度下变性 DNA 停留在凝胶的不同位置, 由此得到分离。针对乳酸菌 V3 区 DNA 碱基组成差异进行了变性剂梯度的研究。将 3 株不同乳酸菌(*Lactobacillus casei*、*Lactobacillus brevis*、*Lactobacillus fermentum*)的 16SrDNA 基因 V3 区的 PCR 产物等量混合, 然后进行变性剂梯度范围从 0~80% 的聚丙烯酰胺凝胶电泳, 其分离结果如图 1 所示。

图 1 实验结果表明, 在变性剂浓度范围为 0~80% 的凝胶板上, 三种乳酸菌 V3 区域形成陡峭的“S”型曲线, 在凝胶的左边, 变性剂梯度低, DNA 分子未与变性剂发生作用, 仍然是双链形式, 因此沿着电泳方向一直迁移到较远的位置。在凝胶的右边, 由于变性剂梯度高, DNA 进入凝胶即发生部分解链, 因此迁移距离短。在凝胶的中间, 即“S”型曲线的陡峭区域, 对应变性剂梯度的 30%~50% 位置, DNA 分子有不同程度的解链, 致使不同序列的 DNA 片段有不同的迁移距离, 而形成一条陡峭的曲线, 此时迁移到该解链区的

不同 DNA 分子达到最佳分离。由此可知,在变性剂浓度 30%~50% 的范围内乳酸菌 16S rRNA 基因的 V3 区域的 DNA 即可发生变性。

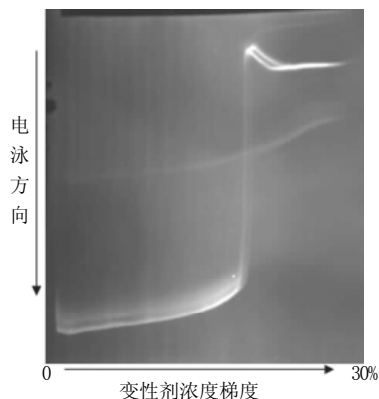


图 1 三株乳酸菌 16S rRNA 基因 V3 区的垂直变性梯度凝胶电泳
Fig.1 Perpendicular DGGE profile of 16S rDNA V3 region of three lactic acid bacteria

制备变性剂浓度为 30%~50% 的聚丙烯酰胺凝胶,将上述三种乳酸菌 V3 区的 PCR 产物进行电泳分析,进一步验证变性剂浓度范围的有效性,结果如图 2 所示。

图 2 结果所示,在变性剂浓度 30%~50% 范围内,得到了相对较为平缓的“S”型曲线,并且三种 V3 区的 DNA 得到了很好分离,表现为三条“S”型电泳曲线完全分开,表明此条件下的变性剂梯度可以用来分离乳酸菌的 V3 区域。鉴于变性聚丙烯酰胺凝胶在制备操作中的偏差并结合图 2 的结果,变性剂的最佳浓度范围选为 30%~55%。

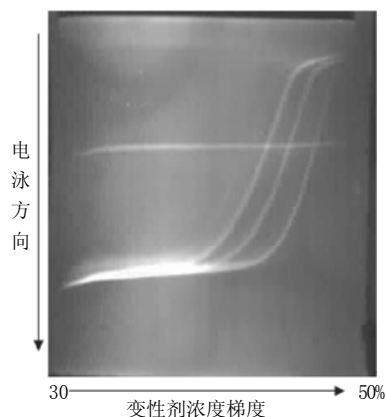


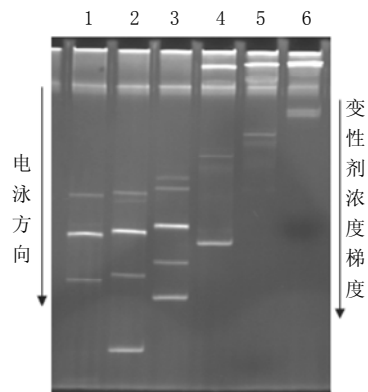
图 2 三种乳酸菌 V3 的 PCR 产物的垂直变性梯度凝胶电泳
Fig.2 Perpendicular DGGE profile of V3 region of three lactic acid bacteria

2.2 DGGE 的电泳时间

在一定规格(16cm × 10cm × 1mm)的胶板上,制备

变性剂浓度范围为 30%~55% 的 10% 聚丙烯酰胺凝胶,采用时间间隔进样法,即每间隔 40min 向进样孔中加入一次 DNA 样品,进行水平 DGGE,其中, DNA 样品为五种乳酸菌(*Lactobacillus plantarum*、*Lactobacillus brevis*、*Lactobacillus delbrueckii*、*Streptococcus thermophilus*、*Lactobacillus fermentum*)V3 区的 PCR 产物的混合物。电泳结果如图 3 所示。

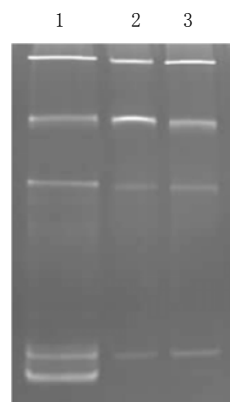
由图 3 可以看出,电泳时间不同,混合 DNA 的分离效率不同,表现为各个泳道中出现不同的 DNA 条带。进样时间越早的泳道,电泳时间越长, DNA 混合样品分离越彻底,但电泳时间过长,有些 DNA 片段迁移出了凝胶边界;电泳时间太短, DNA 片段间得不到很好分离,泳道 2 和泳道 3 出现了完整的五条带,分别代表着五株不同的待分离菌株,由此可以确定在选定上述规格的凝胶板上,200min 左右的电泳时间较为合适。



泳道 1~6 电泳时间分别为 240、200、160、120、80、40min。

图 3 PCR 产物的水平变性梯度凝胶电泳
Fig.3 Time-travel DGGE profile of PCR amplicons

2.3 通用引物对 V3 区扩增效率的影响



1: 常规 PCR 分别扩增 5 种染色体 DNA; 2: 常规 PCR 扩增 DNA 混合模板; 3: 降落 PCR 扩增 DNA 混合模板。

图 4 通用引物扩增效率差异的 DGGE 分析图谱
Fig. 4 DGGE analysis of efficiency during amplification using universal primer

为了验证和比较通用引物对 DNA 混合模板的识别和扩增效率的差异,将以上五种乳酸菌染色体 DNA 各自作模板进行常规 PCR 扩增 V3 区域,然后将 PCR 产物混合进行 DGGE 分析;五株乳酸菌的染色体 DNA 等量混合后作为模板分别进行常规 PCR 和降落 PCR 扩增 V3 区域,扩增产物进行 DGGE 分析。结果见图 4。

由图 4 可知,以五株乳酸菌的染色体 DNA 单独为模板扩增 V3 区域,再将 PCR 产物等量混合后进行 DGGE 后,出现了五条电泳带,分别代表着五株乳酸菌;而将五种乳酸菌染色体 DNA 等量混合后作模板,再进行常规 PCR 和降落 PCR,PCR 产物经 DGGE 后,两种 PCR 扩增产物都出现了四条电泳谱带,比单独以染色体为模板时少了一条带,说明在 DNA 混合样品中,细菌通用引物对模板的扩增有优先选择性或偏爱性,而与使用的 PCR 技术无关。如要进行乳酸菌混合样品的鉴别和检测,还需要使用乳酸菌的专用引物进行补充和完善。

3 讨 论

自 1993 年 Muyzer 等人^[12]首次将 DGGE 技术应用于微生物生态学研究以来,最近在环境微生物学、食品微生物学等应用方面都有成功报道^[8, 13-15]。理论上,只要选择的电泳条件如变性梯度、电泳时间、电压等合适,有一个碱基差异的 DNA 片段都可被分开,从而由混合样品总 DNA 的 DGGE 遗传指纹图谱中获悉微生物的种类和分布。本实验在选择一定大小的凝胶板上,针对乳酸菌 16S rRNA 基因 V3 区域在进行 DGGE 时的变性剂梯度、一定电压下的电泳时间进行了研究,获得了完全分离 V3 区域的电泳条件。由于在制备垂直 DGGE 凝胶时,部分凝胶溶液要传送到另一侧以起到密封胶板的作用,因此电泳结果表现为曲线会向右迁移(图 1、2)。因此,确定最佳的变性剂梯度范围时将结果显示的 30%~50%,改为 30%~55%,以满足实际应用。

罗海峰等^[16]用 DGGE 技术研究了不同 DNA 聚合酶对 PCR 的忠实性,本研究中用普通的 rTaq 聚合酶对细菌 V3 区域的通用引物扩增不同模板时的差异进行了比较,表明 PCR 扩增在一定程度上是模板竞争的结果,通用引物在扩增不同细菌的基因组 DNA 时,会有不同的识别和扩增效率。图 4 结果中实验菌株单独扩增时可得到预期结果,然而当菌株染色体 DNA 混合后作模板,无论常规 PCR 还是降落 PCR,都有一种微生物未被扩增出来,此结果证实了在相同扩增体系中不同模板与引物的结合效率存在差异,致使结合效率差的模板在竞争中处于劣势,造成未被扩增或者扩增效率很低。此外,在模板量相同的情况下,图 4 中 DGGE 条带的明暗度的差别,也反映出不同模板 DNA 在与相同引物结合效率上存在着

差异。

有文献报道^[17-19],在分析 DGGE 指纹图谱时“条带的明暗揭示细菌类群的多寡”、“通过分析样品电泳条带的亮度评估微生物种群相对数量”的观点。从本实验结果来看,上述结论值得商榷,在 PCR-DGGE 分析菌群组成时,通用引物不能保证所有的细菌都能以相同的效率被扩增出来,所以扩增产物进行 DGGE 分析后不可避免地出现 DGGE 条带有不同的强度,实际上 PCR-DGGE 能够检测到的微生物类群都可认为是研究体系中的优势菌群。

DGGE 作为一种分子生物技术,具有固有的局限性,如 PCR 扩增过程偏爱, DGGE 最多能分离几百 bp 的 DNA 片段,只能提供有限的系统发育信息等。因此与其它方法结合使用,如平板培养、形态观察、核酸探针检测技术等,这样不仅可以更客观的从不同方面反映环境中微生物的多样性信息,还可以与其他方法相互补充,从而不断提高微生物分子生态学的研究水平。

参考文献

- [1] FISCHER S G d, LERMAN L S. DNA fragments differing by single base-pair substitutions are separated in denaturing gradient gel: correspondence with melting theory[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1983, 80 (6): 1579-1583.
- [2] MYERS R M, FISCHER S G, LERMAN L S, et al. Nearly all single base substitution in DNA fragments joined to a GC-clamp can be detected by denaturing gradient gel electrophoresis[J]. Nucleic Acids Res, 1985, 13 (9): 3131-3145.
- [3] HUGENHDTZ P, GOEBEL B M, d PACE N R. Impact of culture independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity[J]. J Bacteriology, 1998, 180 (18): 4765-4774.
- [4] RENOUF V, CLAISSE D, MIOT-SERTIER C, et al. Lactic acid bacteria evolution during winemaking: Use of *spoB* gene as a target for PCR-DGGE analysis[J]. Food Microbiology, 2006, 23 (2): 136-145.
- [5] KLIJN N, WEERKAMP A H, DE-VOS W M. Identification of mesophilic lactic acid bacteria by using polymerase chain reaction-amplified variable regions of 16S rRNA and specific DNA probes[J]. Appl Environ Microbiol, 1991, 57 (11): 3390-3393.
- [6] RANDAZZO C L, TORRIANI S, AKKERMANS A D L, et al. 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 (4): 1882-1892.
- [7] FASOLI S, MARZOTTO M, RIZZOTTI L, et al. Bacterial composition of commercial probiotic products as evaluated by PCR-DGGE analysis[J]. International Journal of Food Microbiology, 2003, 82: 59-70.
- [8] MEROTH C B, WALTER J, HERTEL C, et al. Monitoring the bacterial population dynamics in sourdough fermentation processes by using PCR-denaturing gradient gel electrophoresis[J]. Appl Environ Microbiol, 2003, 69 (1): 475-482.
- [9] TEMMERMAN R, SCHEIRLINCK I, HUYS G, et al. Culture-independent analysis of probiotic products by denaturing gradient gel

- electrophoresis[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2003, 69(1): 220-226.
- [10] NIWA T, KAWAMURA Y, KATAGIRI Y, et al. Lytic enzyme, labiase for a broad range of Gram-positive bacteria and its application to analyze functional DNA/RNA[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2005, 61: 251-260.
- [11] OMAR N B, d AMPE F. Microbial community dynamics during production of the mexican fermented maize dough pozol[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2000, 66(9): 3664-3673.
- [12] MUYZER G, WAAL E C D, UITTERLINDEN A G. Profiling of complex microbial population by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1993, 59(3): 695-700.
- [13] FERRIS M J, MUYZER G, WARD D M. Denaturing gradient gel electrophoresis profile of 16S rRNA-defined populations inhabiting a hot spring microbial mat community[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1996, 62(2): 340-346.
- [14] SMALLA K, WIELAND G, BUCHNER A, et al. Bulk and rhizosphere soil bacterial communities studied by denaturing gradient gel electrophoresis: plant-dependent enrichment and seasonal shift revealed[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2001, 67(10): 4742-4751.
- [15] GOMES N C M, FAGBOLA O, COSTA R, et al. Dynamics of fungal communities in bulk and maize rhizosphere soil in the tropics[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2003, 69(7): 3758-3766.
- [16] 罗海峰, 齐鸿雁, 张洪勋. 不同DNA聚合酶对PCR-DGGE研究土壤微生物多样性的影响[C]//第五届微生物生态学术研讨会会议论文集. 北京: 气象出版社, 2003: 41-47.
- [17] 邢德峰, 任南琪, 宋佳秀, 等. 不同16S rDNA靶序列对DGGE分析活性污泥群落的影响[J]. *环境科学*, 2006, 27(7): 1424-1428.
- [18] 李智勇, 何丽明, 吴杰, 等. 基于PCR-DGGE基因指纹的对虾体内优势细菌分析[J]. *微生物学通报*, 2005, 32(3): 82-86.
- [19] 付琳琳, 曹郁生, 李海星, 等. 应用PCR-DGGE技术分析泡菜中乳酸菌的多样性[J]. *食品与发酵工业*, 2005, 31(12): 103-105.