

PCR-DGGE 技术及其在发酵食品微生物研究中的应用

江芸^{1,2}, 高峰, 徐幸莲, 周光宏* (1. 南京农业大学农业部农畜产品加工与质量控制重点开放实验室, 江苏南京 210095; 2. 南京师范大学金陵女子学院食品科学系, 江苏南京 210097)

摘要 多聚酶链反应-变性梯度凝胶电泳分析技术(PCR-DGGE)是近年来微生物学研究中应用较广泛的分子技术之一。介绍了 DGGE 的基本原理及其在食品微生物学中的应用,着重阐述了 PCR-DGGE 在发酵食品研究中的应用进展。

关键词 变性梯度凝胶电泳; 食品微生物学; 发酵食品

中图分类号 Q503 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2007)21-06591-03

PCR-DGGE and its Application in the Research on Fermented Food Microbiological

JIANG Yun et al (Key Laboratory of Agricultural and Animal Products Processing and Quality Control, Ministry of Agriculture, Nanjing Agricultural University, Nanjing, Jiangsu 210095)

Abstract PCR-DGGE is a kind of molecular biological technique applied widely in microbiology in recent years. In the paper, the principle of DGGE and its application in food microbiology were reviewed. The application of PCR-DGGE in fermented food research was illustrated outstandingly.

Key words Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE); Food microbiology; Fermented food

据报道,在自然界中有相当多的微生物(90%~99%)用传统方法无法培养出来,且传统微生物技术在对微生物菌群进行培养时,不可避免地会造成菌株的富集或衰减,这就人为地改变了原始菌群的微生态构成,对研究结果造成较大偏差^[1-2]。近年来,随着分子生物学的发展,基于 DNA 指纹技术的分子生物学研究手段越来越多地被引入到微生物学研究中,其中 DGGE 因具有可靠性强、重现性高、方便快捷等优点而越来越受到重视,是近年来微生物学研究中应用较广泛的分子技术之一。

DGGE 技术是由 Fischer 和 Lerman 于 1979 年最先提出的用于检测 DNA 突变的一种电泳技术^[3]。1993 年 Myzer 等^[4]首次将 DGGE 技术应用于微生物生态学研究,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。笔者主要介绍 DGGE 的基本原理及其在发酵食品微生物研究中的应用进展。

1 PCR-DGGE 技术的基本原理

DGGE 是一种可将长度相同而序列不同的 DNA 片段分离开的电泳方法。其基本原理是^[4-5]:DNA 分子中 4 种碱基的组成和排列差异,使不同序列的双链 DNA 分子具有不同的解链温度。当双链 DNA 分子在含梯度变性剂(尿素、甲酰胺)聚丙烯酰胺凝胶中进行电泳时,因其解链的速度和程度与其序列密切相关,所以当某一双链 DNA 序列迁移到变性凝胶的一定位置,并达到其解链温度时,即开始部分解链,部分解链的 DNA 分子的迁移速度随解链程度增大而减小,从而使具有不同序列的 DNA 片段滞留于凝胶的不同位置,结束电泳时,形成相互分开的带谱。理论上认为,只要选择的电泳条件如变性剂梯度、电泳时间、电压等足够精细,有一个碱基差异的 DNA 片段都可被分开。

由于 DNA 分子中的 G、C 碱基对要比 A、T 碱基对结合得牢固,因此 G、C 含量高的区域具有较高的解链温度。基于这一原理,“GC 夹板”(GC-clamp)技术将一段长度为 30~50 bp

富含 G、C 的 DNA 碱基片段附加到双链的一端以形成一个人工高温解链区。这样, DNA 片段的原有部分就处于低温解链区从而可实现更好的分离^[6-7]。

该技术的主要操作过程如下: 样品预处理; 样品 DNA(或 RNA)提取及纯化; 16S rDNA 或基因片段的 PCR(或 RT-PCR)扩增; 预实验(DGGE 条件优化); 制胶; 样品的 DGGE 分析; 图谱分析; 条带序列分析。

2 PCR-DGGE 技术在食品微生物研究中的应用

(1) 分析食品中微生物的多样性。从食品直接提取总 DNA,经 PCR 扩增,通过 DGGE 得到带谱。因为每个条带很可能就代表一个不同的微生物物种,所以 DGGE 带谱中条带的数量,即反映出该食品微生物群落中优势类群的数量。

(2) 食品中微生物变化的动态监测。DGGE 技术可同时分析多份样品,可用于监测食品中微生物在时间或空间上的动态变化,尤其是食品发酵过程中微生物的动态变化。

(3) 食品中微生物的快速鉴定。从食品直接提取总 DNA,经 PCR 扩增,通过 DGGE 得到带谱,进一步采用种或类群专一性探针与得到的条带进行杂交或将条带切下,重新扩增后测序,或直接与对照微生物在同样条件下 DGGE 电泳产生的参考梯度进行比较,可以快速鉴定出未知微生物。

与传统微生物学方法相比,PCR-DGGE 在研究发酵食品微生物时具有不同的操作程序。PCR-DGGE 不需要采用培养方法,而是直接从食物样品中提取总 DNA,这样能检测到难以培养或不能培养的微生物,能够同时检测多种微生物,而且检测速度快。Coclin 等^[8]研究意大利香肠发酵动力学变化,采用 PCR-DGGE 方法在取样后 8 h 内得到结果。

3 PCR-DGGE 技术在发酵食品微生物研究中的应用进展

3.1 发酵乳制品 Ercolini 等^[9]研究 Mozzarella 奶酪生产时天然乳清培养物中的微生物多样性,对乳清培养物的 V3 区进行 PCR-DGGE 分析,鉴定出 *Streptococcus thermophilus*、*Lactococcus lactis*、*L. delbrueckii* 及 *L. crispatus*。

Randazzo 等^[10]采用 PCR-DGGE 技术研究手工制作的西西里岛干酪生产过程中菌群的多样性及动态变化。DGGE 和序列分析表明,一些嗜温乳酸菌包括 *Leuconostoc*、*Lactococcus lactis* 和 *Macroccoccus caseolyticus* 的一些种在生奶中是优势菌,

基金项目 江苏省科技厅成果转化资金项目(BA2005009)。

作者简介 江芸(1971-),女,江苏盐城人,在读博士,副教授,从事肉品质量控制研究。* 通讯作者。

收稿日期 2007-03-27

而 *Streptococcus thermophilus* 在乳酸发酵过程中占据优势,其他嗜热乳酸菌,特别是 *Lactobacillus delbrueckii*、*Lactobacillus fermentum* 在干酪的成熟过程中生长也很旺盛。分析表明,与常规培养方法比较,除了 *Lactobacillus delbrueckii* 外,许多在干酪成熟过程中占优势的种群不能用培养方法检测出来。

Cocolin 等^[11] 用 PCR-DGGE 技术研究 *Clostridium* 与奶酪后期变味的关系,用引物 P1V1 和 P2V1 对 16S rDNA 的 V1 区 PCR 扩增, DGGE 和序列分析证实, *Clostridium* 与奶酪后期变味有关。

Randazzo 等^[12] 用常规微生物分离培养方法和 PCR-DGGE 技术研究传统手工制作的 Pecorino Siciliano (PS) 奶酪和实验室制作的 PS 奶酪的细菌多样性和动态变化。常规微生物培养分离,进一步用 RFLP 鉴定两种 PS 奶酪中的细菌均主要为 *Lactococcus lactis*、*Streptococcus thermophilus*、*Enterococcus faecalis* 和 *Leuconostoc mesenteroides*; 对手工 PS 奶酪的 V6~V8 区进行 PCR-DGGE 分析,鉴定出优势菌为 *Streptococcus bovis* 和 *Lactococcus lactis*; DGGE 分析表明,两种 PS 奶酪成熟过程中 DGGE 的主要条带具有类似的变化趋势。

Hóez 等^[13] 研究西班牙 Cabrales 奶酪制作过程中的优势菌,直接提取样品 DNA,对细菌 16S rDNA 的 V3 区、真菌 26S rDNA 的 D1 区进行 PCR 扩增,结果表明,粗制凝乳酶中优势菌主要是 *Lactobacillus*, 包括植物乳杆菌 *L. plantarum*; 原料乳中优势菌是乳酸球菌样细菌,以 *L. lactis* 最多,该菌也是奶酪(包括表面及中心)中的优势菌。

3.2 发酵肉制品 Cocolin 等^[8] 研究意大利一种天然发酵香肠成熟过程中细菌动态变化,直接提取香肠 DNA 和 RNA,对 V1 区进行 PCR 及反相 PCR 扩增,通过 DGGE 及序列分析,结果表明,在发酵前 3 d 乳酸菌、*Micrococcaceae* 及一些污染菌(如 *Brochothrix thermosphacta* 和 *Enterococcus* 等)共存,3 d 后则乳酸菌成为优势菌。传统培养分离方法结合 PCR-DGGE 分析,发现发酵早期主要的乳酸菌是 *Lactobacillus sakei*, 而发酵末期 *Lact. curvatus* 成为优势菌。Cocolin 等^[14] 还从意大利自然发酵香肠中分离出 90 株 *Micrococcaceae* 菌株,提取细菌 DNA,采用引物 338f 和 518r 对 16S rDNA 的 V1 区进行 PCR 扩增及 DGGE,同时用标准菌株优化 PCR-DGGE 条件。结果表明,与标准菌株 DGGE 图谱对照,发酵香肠中主要是 *Staphylococcus xylosum*、*S. carnosus* 和 *S. simulans*。

Baiotta 等^[15] 联合应用 PCR-DGGE 和 ISR-PCR 技术分析意大利发酵香肠中分离培养的 *Staphylococci*。对 16S rDNA 的 V3 区进行 PCR 扩增及 DGGE,图谱分析主要鉴定为 *S. sciuri*、*S. haemolyticus*、*S. hominis*、*S. auricularis*、*S. condimenti*、*S. kloosi*、*S. vitulus*、*S. succinus*、*S. pasteurii*、*S. capitis* 和 *S. caseolyticus*。结合 ISR-PCR 分析,绝大部分 *Staphylococci* 可鉴别出来,除了 *S. equorum*、*S. cohnii* 两者之间及 *S. carnosus*、*S. schleiferi* 两者之间。

Rantsiou 等^[16] 采用 PCR-rpoB/DGGE 技术,用引物 rpoB1698f、rpoB2014r 和 rpoB2 扩增 rpoB 基因 350 bp 的区域,研究意大利发酵香肠成熟过程中乳酸菌的动态变化,结果表明,第 0 天和第 3 天优势菌是 *Staphylococcus xylosum*, 第 10 天优势菌是 *Lact. plantarum* 和 *Lact. sakei*, 且前者 *Lact. plantarum*

到发酵末期仍存在,后者 *Lact. sakei* 在第 30 天成熟时未检出,而检出了 *Lact. curvatus*。

Fortana 等^[17] 用 PCR-DGGE 技术监测两种手工制作的阿根廷干发酵香肠的发酵过程并分析其中的细菌群落。Tucumán 香肠经选择性培养,随机挑取 100 个纯菌落,采用引物 bact-0124f(GC)-Uri-0515r 对 16S rDNA 的 V2~V3 区进行 PCR-DGGE 分析,表明 60% 的菌株为 *Lact. sakei*; 采用引物 V1f(GC)-V1r 对 16S rDNA 的 V1 区进行 PCR-DGGE 分析,得到相似图谱,但条带更多。直接提取 Tucumán 香肠 DNA,采用引物 V3f(GC)-Uri-0515r 对 16S rDNA 的 V3 区进行 PCR-DGGE 分析,结果表明,0~14 d 共包括 *Lact. plantarum*、*Lact. sakei*、*S. saprophyticus*、*Corynebacterium variabilis* 及一种未培养细菌 5 种条带;比较两种香肠在成熟期 DGGE 图谱,表明 *Lact. sakei* 在两种香肠中都存在, Tucumán 香肠中还有 *Staphylococcus saprophyticus* 及一种未培养细菌条带, Córdoba 香肠中还有 *Brochothrix thermosphacta* 条带。

Rantsiou 等^[18] 研究了意大利东北部当地工厂生产的 3 种自然发酵香肠的微生物变化,采用 PCR-DGGE 图谱及序列分析,结果表明, *Lactobacillus curvatus* 及 *Lact. sakei* 在 3 种香肠均稳定存在,是主要优势菌,另外还有 *Lact. paracasei* 及 *Staphylococcus*。香肠中的酵母主要包括 *Debaryomyces hansenii*、*Candida* 和 *Willopsis saturnus*。Rantsiou 等^[19] 还研究了希腊、匈牙利和意大利的自然发酵香肠发酵过程中乳酸菌的生态,选择性培养共分离到 358 株乳酸菌,对 16S rDNA 的 V1~V3 区进行 PCR 扩增, DGGE 及序列分析共确定为 15 种乳酸菌,包括 *Lactobacillus* (8 种)、*Enterococcus* (2 种)、*Weissella* (2 种)、*Leuconostoc* (2 种) 及 *Lactococcus lactis subsp. lactis*。意大利香肠中以 *Lactobacillus curvatus* 和 *Lactobacillus sakei* 两种乳酸菌为主,希腊香肠中以前一种乳酸菌为主,匈牙利香肠中以后一种乳酸菌为主。

3.3 发酵谷类制品 Manbi 等^[20] 直接从木薯发酵面团提取总 DNA,并对 16S rDNA 的 V3 区 PCR 扩增,然后通过 DGGE 并进一步序列分析得到代表性细菌有 *Lactobacillus*、*Pediococcus*、*Clostridium*、*Propionibacterium* 及 *Bacillus*。

Mroth 等^[21] 采用 PCR-DGGE 和 16S/28S rDNA 序列分析技术研究两种工业化生产的稻米酸面团微生物变化,酸面团在发酵第 1 天优势菌包括 *Candida krusei*、*Saccharomyces cerevisiae* 及乳酸菌 *Lactobacillus fermentum*、*L. gallinarum*、*L. kimchii*、*L. plantarum*、*L. pontis*; 进一步采用 PCR-DGGE 技术分析乳酸菌的变化,发现发酵 3 d 后 *L. pontis* 数量减少而 *L. curvatus* 成为主要乳酸菌。酸面团中含有 *S. cerevisiae*、*L. paracasei*、*L. paralimentarius* 及 1 株未分类乳酸杆菌。

3.4 发酵蔬菜 Jung 等^[22] 研究了 kimchi(一种韩国传统泡菜)发酵过程中微生物的变化,用 gc338f 和 518r 为引物扩增了 16S rDNA 的 V3 区,并用 PCR-DGGE 技术进行分析,实验表明乳酸菌 *Weissella confusa*、*Leuconostoc citreum*、*Lactobacillus sakei* 及 *Lactobacillus curvatus* 是 kimchi 发酵过程中的主要微生物。

付琳琳等^[23] 从中国家庭制作的泡菜液中提取总 DNA,扩增 16S rDNA 的 V7~V8 区,利用 DGGE 技术研究乳酸菌的多样性,分析发现不同泡菜样品间的菌种差异显著,进一步

研究发现泡菜样品中可能含有 *Pediococcus parvulus*、*Lactobacillus plantarum*、*Lactococcus lactis* 及 *Lactobacillus delbrueckii* 等。

3.5 其他发酵食品 Remouf 等^[24] 采用 PCR-rpoB/DGGE 技术,用引物 rpoB1、rpoB1o 和 rpoB2 扩增 rpoB 基因 336 bp 的区域,研究葡萄酒制作过程中乳酸菌的多样性和动态变化,结果表明,酒精发酵开始后 *Oenococcus oeni* 占优势。

Haruta 等^[25] 研究坛发酵米醋,直接提取样品 DNA,引物 357F 和 517R 扩增细菌 16S rDNA V3 区,引物 NS3 和 YM51r 扩增真菌 18S rDNA,DGGE 分析结果表明,发酵起始阶段主要是 *Aspergillus oryzae* 和 *Saccharomyces*,发酵早期 *Saccharomyces* 和乳酸菌共存,在醋酸开始积累阶段乳酸菌则被 *Lactobacillus acetotolerans* 和 *Acetobacter pasteurianus* 取代。

Luciana 等^[26] 研究 3 种传统香醋中的醋酸菌,直接提取微生物 DNA,用引物 WBAC1 和 WBAC2 进行 PCR 扩增,进一步 DGGE 和序列分析表明, *Acetobacter pasteurianus*/*Acetobacter aceti* 是优势菌;同时他们用常规微生物培养方法分离到 19 株醋酸菌,对分离到的细菌采用同样引物进行 PCR 扩增和 DGGE 并进行序列分析,结果 *Acetobacter malorum* 和 *Acetobacter europaeus* 是主要菌种。

4 结语

由上述研究可见,PCR-DGGE 技术可用于鉴定发酵食品中某些特定细菌,检测发酵食品中微生物多样性,跟踪发酵食品中微生物生态变化,在线监测发酵过程,比较不同产地不同生产工艺发酵食品的微生物生态特点等,该技术在发酵食品微生物研究方面是一种有效、快速、简捷、可靠的工具。

DGGE 作为一种分子生物学技术,具有多数分子技术所固有的缺点,如食品成分的复杂性和样品处理可能会使 DNA 提取产生误差,PCR 过程中优先扩增、嵌合体的形成或异源双链的产生等。另外,DGGE 本身也存在一些缺陷。如:只能分离较小的片段(1 kb 以下),提供有限的信息量;DGGE 条件不适宜时,可能导致条带共迁移现象;有些细菌具有多操纵子,使同一种菌的 DGGE 图谱上出现多条带,从而高估样品中微生物的多样性;DGGE 通常只能检测到环境中优势菌群的存在。Myzer 等认为占整个群落细菌数量约 1% 或以上的类群能够检测到^[4]。目前的发展趋势是结合 PCR-DGGE 与其他分子生物学技术及微生物学方法等多种手段,减少不同技术的弊端和局限性,综合各种技术的优势,从而更真实地揭示微生物群落结构和功能的本质。

参考文献

- [1] AMANN RI, LUDWIG W, SCHLEIFER KH. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation[J]. *Microbiological Reviews*, 1995, 59: 143-169.
- [2] RANJARDL, PLOY F, NAZARET S. Monitoring complex bacterial communities using culture-independent, molecular techniques: application to soil environment[J]. *Research in Microbiology*, 2000, 151: 167-177.
- [3] HSHCERS G, LERMAN LS. DNA fragments differing by single base pair substitutions separated in denaturing gradient gels: correspondence with melting theory[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1983, 80: 1579-1583.
- [4] MUZER G, WALL EC, UITTERLINDEN A G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA[J]. *Applied Environmental Microbiology*, 1993, 59: 695-700.
- [5] MUZER G. DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems[J]. *Current Opinion in Microbiology*, 1999, 2: 317-322.
- [6] MYERS R M, FISCHERS G, LERMAN LS, 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 Research*, 1985, 13: 3131-3145.
- [7] SHEFFIELD V C, COX D R, MYERS R M. Attachment of a 40 bp G+C rich sequence (GC clamp) to genomic DNA fragments by polymerase chain reaction results in improved detection of single base changes[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, 86: 232-236.
- [8] COCCINI L, MABAZANO M, CABIONI C, et al. 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]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 67: 5113-5121.
- [9] ERCOLINI D, MOSCHETTI G, BLAIOTTA G, et al. The potential of a polyphasic PCR-DGGE approach in evaluating microbial diversity of natural whey cultures for water-buffalo mozzarella cheese production: bias of culture dependent and culture-independent analyses[J]. *Systematic and Applied Microbiology*, 2001, 24: 610-617.
- [10] RANDAZZO C L, TORRIAN 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: 1882-1892.
- [11] COCCINI L, INNOCENTE N, BLASUTTI M, et al. The late blowing in cheese: a new molecular approach based on PCR and DGGE to study the microbial ecology of the alteration process[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2004, 90: 83-91.
- [12] RANDAZZO C, VAUGHAN E E, CAGGIAC. Artisanal and experimental Pecorino Siciliano cheese: microbial dynamics during manufacture assessed by culturing and PCR-DGGE analyses[J]. *Journal of Food Microbiology*, 2006, 109: 1-8.
- [13] FLÓREZ A B, MAYO B. PCR-DGGE as a tool for characterizing dominant microbial populations in the Spanish blue-veined Cabrales cheese[J]. *International Dairy Journal*, 2006, 10: 1205-1210.
- [14] COCCINI L, MANZANO M, AGGIO D, et al. A novel polymerase chain reaction (PCR)-denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) for the identification of Micrococcaceae strains involved in meat fermentations. Its application to naturally fermented Italian sausages[J]. *Meat Science*, 2001, 57: 59-64.
- [15] BLAIOTTA G, PENNACCHA C, ERCOLINI D, et al. Combining denaturing gradient gel electrophoresis of 16S rDNA V3 region and 16S-23S rDNA spacer region polymorphisms analyses for the identification of *Staphylococci* from Italian fermented sausages[J]. *Systematic and Applied Microbiology*, 2003, 26: 423-433.
- [16] RANISIOU K, COMI G, COCCINI L. The rpoB gene as a target for PCR-DGGE analysis to follow lactic acid bacterial population dynamic during food fermentations[J]. *Food Microbiology*, 2004, 21: 481-487.
- [17] FONTANA C, VIGNOLO G, COCCINELLI P S. PCR-DGGE analysis for the identification of microbial populations from Argentinean dry fermented sausages[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2005, 63: 254-263.
- [18] RANISIOU K, URSO R, IACUMINI L, et al. Current-dependent and independent methods to investigate the microbial ecology of Italian fermented sausages[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71: 1977-1986.
- [19] RANISIOU K, DROSINOS E H, GAITAKI M, et al. Molecular characterization of *Lactobacillus* species isolated from naturally fermented sausages produced in Greece, Hungary and Italy[J]. *Food Microbiology*, 2005, 22: 19-28.
- [20] MIAMI E, GUYOT J P, AMPE F. Identification, isolation and quantification of representative bacteria from fermented cassava dough using an integrated approach of culture-dependent and culture-independent methods[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2008, 82: 111-120.
- [21] MROTH C B, HAMMES W P, HERTEL C. Characterisation of the microbiota of rice sourdoughs and description of *Lactobacillus spicheri* sp. nov.[J]. *Systematic and Appl Microbiol*, 2004, 27: 151-159.
- [22] JUNG SOCK LEE, GUN YOUNG HEO. Analysis of kimchi microflora using denaturing gradient gel electrophoresis[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2005, 102: 143-150.
- [23] 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.
- [24] RENOUF V, CLAISSE O, MOTSERIER C, et al. Lactic acid bacteria evolution during wine making: use of rpoB gene as a target for PCR-DGGE analysis[J]. *Food Microbiology*, 2006, 23: 136-145.
- [25] HARUTA S, UENO S, EGAWA I, et al. Succession of bacterial and fungal communities during a traditional pot fermentation of rice vinegar assessed by PCR-mediated denaturing gradient gel electrophoresis[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2006, 109: 79-87.
- [26] LUCIANA DE VERO, GALA E, GULLO M, et al. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) analysis to evaluate acetic acid bacteria in traditional balsamic vinegar[J]. *Food Microbiol*, 2006, 23(8): 809-813.