

利用 PCR-DGGE 技术快速检测鉴定饲用微生物

孙晓棠¹, 龙良鲲¹, 崔汝强², 姚青², 朱红惠¹

(1 广东省微生物研究所, 广东省菌种保藏与应用重点实验室, 广东省微生物应用新技术公共实验室, 广东 广州 510070; 2 华南农业大学 园艺学院, 广东 广州 510642)

摘要:针对目前国内外对饲用微生物添加剂中多种微生物的检测缺乏简捷有效手段这一现实状况, 通过 PCR-DGGE 方法建立了地衣芽孢杆菌 *Bacillus licheniformis*、粪肠球菌 *Enterococcus faecalis*、植物乳杆菌 *Lactobacillus plantarum*、干酪乳杆菌 *Lactobacillus casei* 4 种标准菌株的分子指纹图谱, 建立了一套这 4 种微生物的快速同步检测技术, 并用该检测技术对市场上一一种饲用微生物添加剂进行分析, 结果判定其含有 6 种优势菌群, 包括植物乳杆菌和干酪乳杆菌. 本技术还可以推广应用到目前国家允许添加的其他 16 种饲用微生物的检测, 为饲用微生物添加剂产品质量监控提供了技术支撑.

关键词:饲用微生物; 检测; PCR-DGGE

中图分类号: Q938

文献标识码: A

文章编号: 1001-411X(2010)04-0072-04

Detection and Identification of Direct-Fed Microbials by PCR-DGGE

SUN Xiao-tang¹, LONG Liang-kun¹, CUI Ru-qiang², YAO Qing², ZHU Hong-hui¹

(1 Guangdong Institute of Microbiology, Guangdong Provincial Key Laboratory of Microbial Culture Collection and Application, Guangdong Provincial Common Laboratory of Microbial Applied Technology, Guangzhou 510070, China;
2 College of Horticulture, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: Total DNA was extracted from strains *Bacillus licheniformis*, *Enterococcus faecalis*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei* and the mixed sample of the four stains. The V3 regions of 16S rDNA were amplified by PCR and the PCR products were analyzed by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). Then DGGE bands of sample could be identified by comparing the migration distance with those of finger-printing. The results suggested that the DGGE technique is a rapid method to detect the direct-fed microbials. Six dominant microorganisms including *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus casei* in direct-fed microbials were detected by DGGE technique.

Key words: direct-fed microbials; detection; PCR-DGGE

饲用微生物添加剂是一类多种活体微生物的混合制剂, 产品中所含有益微生物的种类和数量是产品质量的主要指标之一. 目前, 国内关于饲用微生物添加剂中有效微生物的检测处于空缺状态. 相关的行业标准或国家标准仍未出台, 适合参照引用的标

准仅有细菌总数、酵母和霉菌总数, 而目前绝大多数饲用微生物添加剂是多种微生物的混合菌剂, 利用平板计数法和选择性培养方法, 只能检测菌落总数或者单一的特定菌, 不能全面反映产品品质; 而关于饲用微生物添加剂中多种微生物及其含量的检测方

收稿日期: 2009-12-11

作者简介: 孙晓棠 (1980—), 女, 助理研究员, 硕士; 通信作者: 朱红惠 (1970—), 女, 研究员, 博士, E-mail: zhuhonghui66@yahoo.com.cn

基金项目: 广东省科技计划项目 (2007B030801003); 广州市越秀区科技计划项目 (2007-GX-020)

法的研究,国内至今鲜见报道,因此必须寻找新的检测方法.

PCR-DGGE 是近年来发展起来的一种分子生态学技术,能使混合 DNA 样品中大小相同但序列组成不同的 DNA 分子在凝胶中得以分离,而这些序列不同的 DNA 分子,代表了样品中不同的微生物,这样能以指纹图谱的形式直观地反映各种微生物,主要用于复杂环境样品中微生物群落结构及数量分布的分析^[1-2]. 本研究将 PCR-DGGE 技术用于饲用微生物的检测,建立了常用的几种饲用微生物快速同步检测技术,该技术能客观地反映产品中微生物菌种组成,可作为产品质量控制和动态监测的快速简便的新方法.

1 材料与方法

1.1 供试菌种

4 种饲用微生物菌种地衣芽孢杆菌 *Bacillus licheniformis* ATCC11946、粪肠球菌 *Enterococcus faecalis* ATCC29212、植物乳杆菌 *Lactobacillus plantarum* ATCC8014 和干酪乳杆菌 *Lactobacillus casei* ACCC10639,均由广东省微生物菌种保藏中心提供.

1.2 供试菌基因组 DNA 的提取

菌体基因组总 DNA 的提取按 Ellis 等^[3]的方法.

1.3 饲用微生物添加剂样品 DNA 的提取与纯化

为了从饲用微生物添加剂中抽提获得较好的 DNA 用作 PCR 扩增的模板,本文对报道的几种抽提方法进行了试验比较. 方法 I:热休克法^[4];方法 II: Bead Beating 法^[5];方法 III:孙晓棠等^[6]的方法. 抽提的 DNA 样品,经 DUR-640 型紫外分析仪和琼脂糖凝胶电泳进行分析比较. 粗提 DNA 采用 Promega 公司的 Wizard DNA Clean-Up System 试剂盒进行纯化.

1.4 16S rDNA 的 Nested PCR 扩增

利用 Nested PCR 对所有样品 16S rDNA V3 高变区进行扩增. 反应 I 所用引物为细菌 16S rDNA 全长通用引物 F8-27 和 R1541-1522,扩增 15 个循环. 反应 II 所用引物为细菌 16S rDNA V3 高变区 F341-357 (GC)和 R534-518,以 1/10 的第 1 次 PCR 扩增产物作为模板,反应程序为 94 °C 5 min 预变性;94 °C 30 s,60 ~ 55 °C 30 s(每循环降低 0.5 °C),72 °C 2 min,30 个循环;72 °C 7 min. 扩增产物用 15 g · L⁻¹ 琼脂糖凝胶分析检验.

1.5 DGGE 分析

PCR 产物浓缩后,采用 D-Code 突变检测系统 (Bio-Rad, Hercules, Calif.) 对样品进行 DGGE 分析.

采用 8% 的聚丙烯酰胺凝胶,变性梯度为 35% ~ 60% (100% 的变性剂为 7 mol · L⁻¹ 尿素,40% 甲酰胺),180 V,60 °C 恒温,0.5 × TAE 中电泳 4.0 h, GoldView 染料染色 30 min, UVI 成像系统拍照.

1.6 DNA 的回收测序

无菌条件下切下 DGGE 胶上的条带,加 30 μL ddH₂O,用枪头将凝胶压碎,4 °C 过夜. 10 000 g, 10 min 离心. 分别取上清液梯度稀释后作模板进行 16S rDNA V3 可变区域扩增(条件同 1.4). PCR 产物经 DGGE 后证明与所割条带位于相同的迁移位置,再割胶回收,用不含 GC 夹子的引物再次扩增 16S rDNA V3 可变区序列,纯化后用 10 g · L⁻¹ 琼脂糖凝胶电泳检验,产物送上海生物工程技术服务公司测序. 登录 NCBI,将所得序列与 GenBank 数据库中已知序列进行比对.

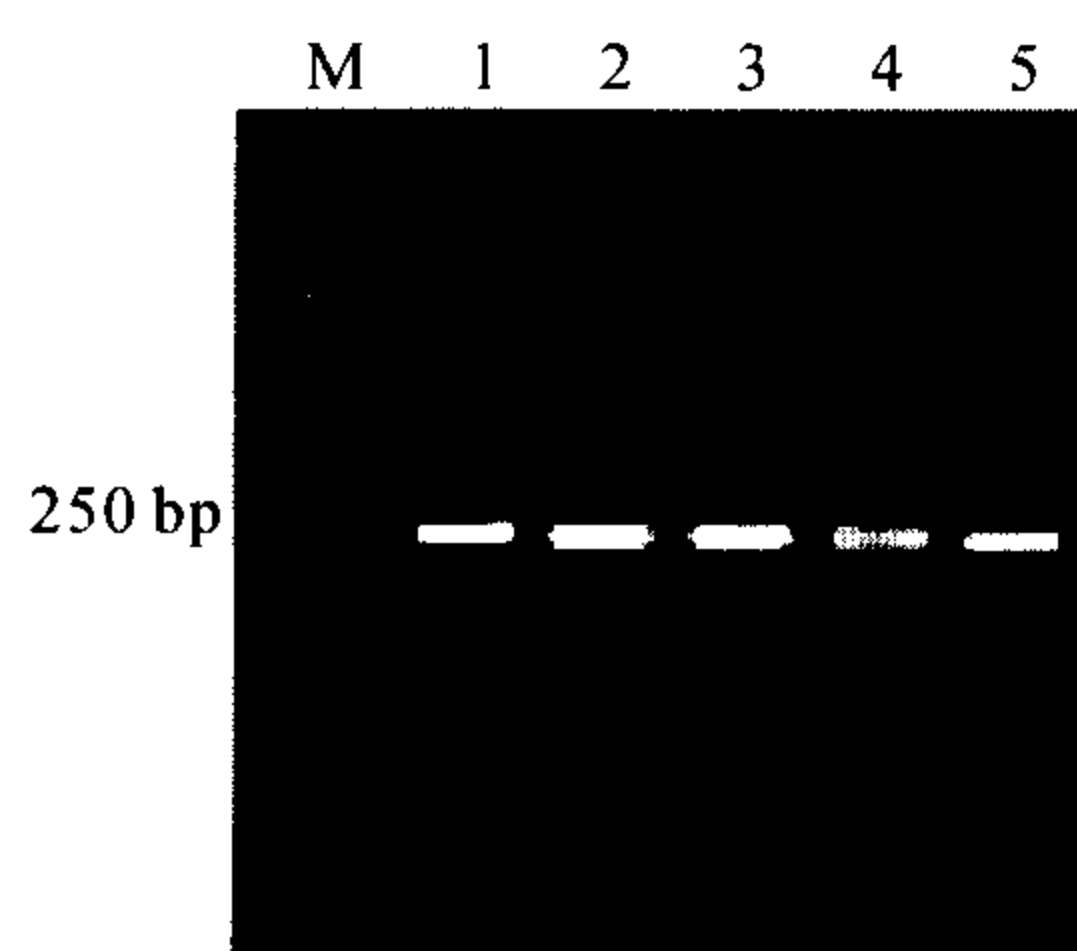
2 结果与分析

2.1 饲用微生物添加剂 DNA 提取方法的比较分析

饲用微生物添加剂成分复杂,传统的对纯培养微生物提取 DNA 的方法很难直接应用到饲料样品的研究中. 本文比较了 3 种不同的 DNA 提取方法. 所提取总 DNA 大小依次为方法 I > 方法 II > 方法 III. 以 DNA 产量为评估指标,方法 III 从每克样品中提取到的 DNA 量最多,其次是方法 II,方法 I 提取到的 DNA 量较少. 提取的总 DNA 的 $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 比值为方法 II > 方法 III > 方法 I, $D_{260\text{ nm}}/D_{230\text{ nm}}$ 比值为方法 III > 方法 II > 方法 I. 3 种方法在时间上都只需 5 ~ 6 h,方法 II 和方法 III 裂解方法相同,均使用 DNA 提取液和 SDS 一步裂解细胞,操作简单,只是方法 III 样品经过预处理,延长了操作时间. 方法 I 使用反复冻融、溶菌酶、SDS 溶液多步裂解细胞,操作相对繁琐. 因此综合来看,方法 II 更适合用于饲用微生物添加剂总 DNA 的提取.

2.2 16S rDNA V3 高变区的 PCR 扩增

饲用微生物添加剂内含多种微生物,无论是优势扩增,还是嵌合片段的产生,无疑将对微生物种群的认识产生扭曲. 因此优化 PCR 反应的体系和严格控制 PCR 反应的条件是非常重要的. 本文为提高灵敏度且保证扩增产物的丰富度和特异性,采用了 Nested PCR 和降落 PCR 策略,将抽提所得的总 DNA 适当稀释后作为模板,扩增细菌的 16S rDNA V3 高变区,都得到大小为 250 bp 左右的单一特异性扩增片段,适合于 DGGE 分析,结果如图 1 所示.



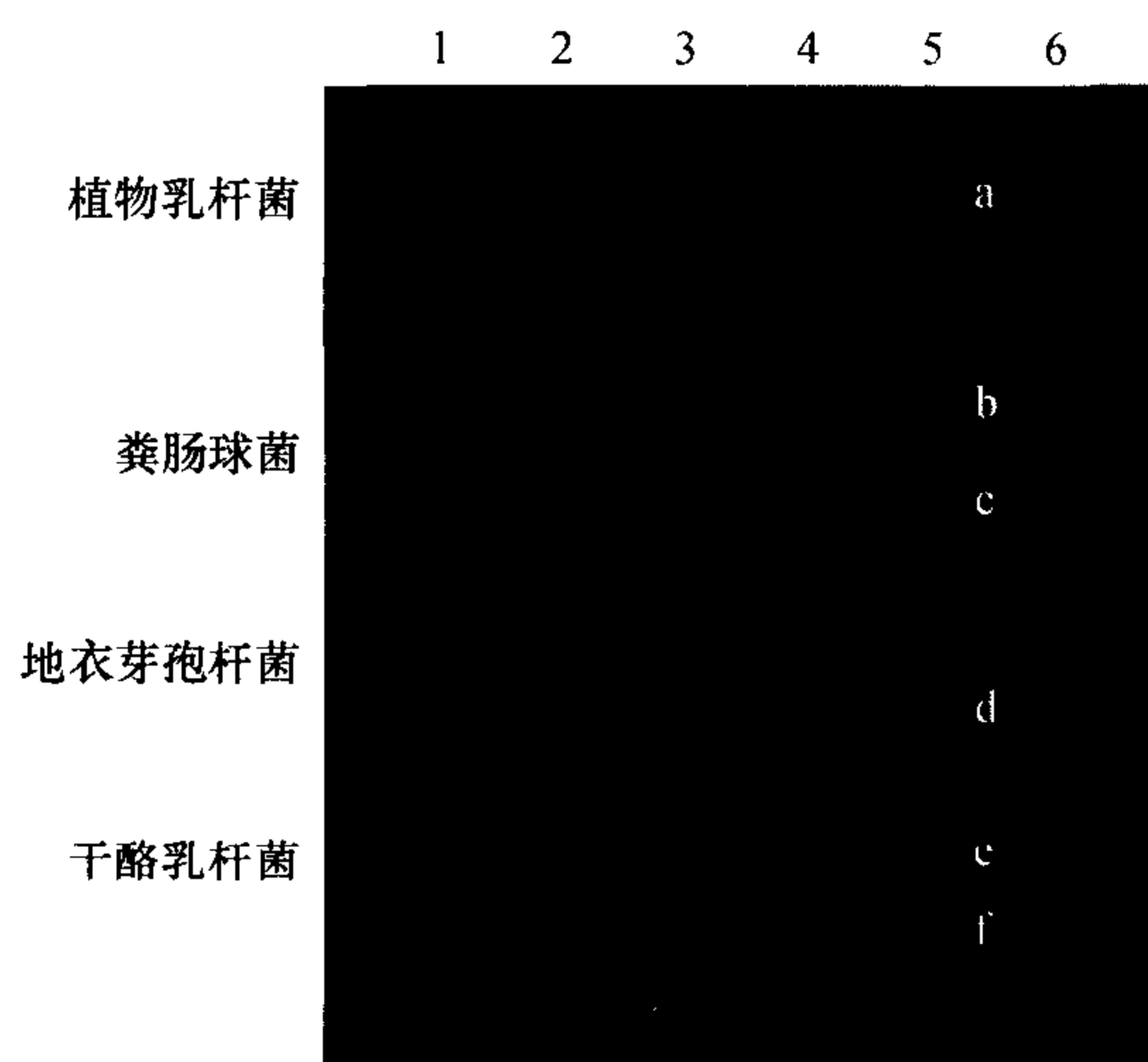
M:4 种菌混合;1:植物乳杆菌 ATCC8014;2:干酪乳杆菌 ACCC10639;3:粪肠球菌 ATCC29212;4:地衣芽孢杆菌 ATCC11946;5:饲用微生物添加剂样品.

图1 不同样品的16S rDNA V3区扩增结果

Fig. 1 V3 fragment of different samples amplified by PCR

2.3 DGGE 分析

从 DGGE 图谱(图2)可以看出地衣芽孢杆菌、粪肠球菌、植物乳杆菌和干酪乳杆菌4种标准菌株分别迁移在不同的位置,均能很好地分开,而且条带单一、清晰.因此 DGGE 图谱能很好地区分这4种菌,适合这4种菌的快速检测.在单一菌株 DGGE 指纹图谱的基础上,将4种单一菌株按相同的比例混合,进行 DNA 提取和 PCR-DGGE 分析,建立了标准菌株的混合指纹图谱.从4种单一菌株指纹图谱可以判断混合菌条带从上至下依次为植物乳杆菌、粪肠球菌、地衣芽孢杆菌和干酪乳杆菌.



1:4 种菌混合标准品;2:植物乳杆菌 ATCC8014;3:干酪乳杆菌 ACCC10639;4:粪肠球菌 ATCC29212;5:地衣芽孢杆菌 ATCC11946;6:饲用微生物添加剂样品.

图2 不同样品的 DGGE 图谱

Fig. 2 DGGE profile of different samples

对直接从饲料微生物添加剂提取的 DNA 样品和混合菌株 DNA 样品进行 16S rDNA V3 区扩增,扩增产物进行 DGGE 分析.结果发现,该饲料微生物添加剂样品在 DGGE 图谱中出现了6条电泳带(图2中泳道6),分别代表该样品中的6种优势菌群,参照

标准菌株的混合指纹图谱,条带 a 和 e 的迁移位置分别对应于植物乳杆菌和干酪乳杆菌的位置,可以直接鉴定出该样品中含有植物乳杆菌和干酪乳杆菌.为验证 DGGE 鉴定结果以及获取未知条带信息,对 DGGE 凝胶中的条带 a~f 进行切胶回收,扩增测序,在 NCBI 上用 BLAST 软件在 GenBank 中与参考序列进行相似性比对后发现,条带 a 与植物乳杆菌同源性最高为 100%,条带 e 与干酪乳杆菌同源性最高为 100%,与 DGGE 直接鉴定结果一致.而条带 b、c、d、f 分别与嗜酸乳杆菌 *L. acidophilus*、蜡样芽孢杆菌 *B. cereus*、枯草芽孢杆菌 *B. subtilis* 和类干酪乳杆菌 *L. paracase* 同源性最高.

3 讨论

饲用微生物添加剂作为一类新型无公害饲料资源,近年来越来越受到重视.但是目前这一产品也存在诸多问题,主要表现在:产品中实际使用的微生物与产品标识不符或超出国家允许的微生物名单,产品中各种微生物的实际含量与产品标识不符或标识中缺少微生物含量这一项目等.而目前我国仍未有饲用微生物添加剂产品的相关标准出台,产品质量完全依靠企业自身把关.在我们实际检测工作中也发现,一些企业仅对部分产品中单一微生物或产品菌落总数进行检测,少数企业甚至根本不送检,产品质量得不到保障.

上述问题的存在,最主要的原因是缺乏对多种微生物混合制剂的有效检测手段.目前市场上的饲用微生物添加剂,以复合菌剂即多种微生物混合制剂为主,单一菌制剂很少.对于这类多种微生物混合制剂的微生物检测,目前只能靠平板分离法分离后,再进行形态和生理生化的鉴定.这种方法不仅费时费力,而且有时不准确,因为平板分离法主要依靠菌落形态进行分离,对于一些相近种或菌落形态相似的种无法准确分离,从而漏检甚至错检.因此,建立一套能同时检测多种有效微生物的快速检测方法,成为饲用微生物添加剂标准制订中的首要任务.

PCR-DGGE 是近年来发展起来的一种分子生态学技术.2003 年 Temmerman 等^[7]将该方法引入益生菌产品的检测中,对欧洲 10 个产品进行检测,发现有 4 个产品不含所标示的微生物,并认为 PCR-DGGE 技术在分析益生菌类产品的微生物组成和含量中有着极大的优势和应用潜力.随后 Elliot 等^[8]检测了南非 9 个益生菌产品,发现仅 3 个产品含有所标示的微生物.国内马俊孝等^[9]利用 PCR-DGGE 技术分析微生态制剂在传代过程中的菌群变化.本

研究利用 PCR-DGGE 技术建立了一套饲用微生物地衣芽孢杆菌、粪肠球菌、植物乳杆菌、干酪乳杆菌的快速同步检测技术. 只要将待测饲用微生物制剂样品和标准品同时进行 DGGE 指纹图谱分析, 观察待测样品的 PCR 产物经 DGGE 分离后的电泳图谱, 根据标准品中这 4 种菌条带的位置即可判断待测样品中这 4 种菌的有无情况. 通过条带的亮度进行软件分析还可进一步半定量地确定该菌的含量. 本技术还可以推广应用到目前国家允许添加的其他 16 种饲用微生物的检测.

参考文献:

- [1] MUYZER G, WAAL E C, 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]. Appl Environ Microbiol, 1993, 59(3): 695-700.
- [2] 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 shifts revealed [J]. Appl Environ Microbiol, 2001, 67(10): 4742-4751.
- [3] ELLIS R J, THOMAPSON I P, BAILEY M J. Temporal fluctuations in the pseudomonas population associated with sugar beet leaves [J]. FEMS Microb Ecol, 2000, 28: 3996-4001.
- [4] BOURRAIN M, ACHOUAK W, URBAIN V, et al. DNA extraction from activated sludge [J]. Curr Microbiol, 1999, 38(6): 315-319.
- [5] YEATES C, GILLING M R. Methods for microbial DNA extraction from soil for PCR amplification [J]. Biological Procedures Online, 1998, 1: 40-47.
- [6] 孙晓棠, 姚青, 刘琼光, 等. 利用 DGGE 评价不同培养基回收番茄根际细菌类群的能力 [J]. 微生物学报, 2006, 46(3): 482-486.
- [7] TEMMERMAN R, SCHEIRLINCK I, HUYS G. Culture-independent analysis of probiotic products by denaturing gradient gel electrophoresis [J]. Appl Environ Microbiol, 2003, 69(1): 1220-1226.
- [8] ELLIOT E, TEVERSHAM K. An evaluation of nine probiotics available in South Africa [J]. S Afr Med J, 2004, 94(2): 121-124.
- [9] 马俊孝, 孔健, 季明杰. 利用 PCR—DGGE 技术分析微生物生态制剂在传代过程中的菌群变化 [J]. 山东大学学报, 2008, 43(7): 56-160.
- [10] LUO Xiao-ying, ZHUANG Xue-ying, YANG Yue-sheng. Genetic diversity of *Camellia changii* Ye (Theaceae) using ISSR markers [J]. 热带亚热带植物学报, 2007, 15(2): 93-100.
- [11] KAPIL R N, SETHI S B. Development of male and female gametophytes in *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, India, 1963, 29(B): 567-574.
- [12] 曹慧娟. 油茶胚胎学的观察 [J]. 植物学报, 1965, 13(1): 44-53.
- [13] CHARIVUKALA J M. Development of male and female gametophytes in *Camellia sasanqua* [J]. Phytomorphology, 1978, 28(3): 262-269.
- [14] 刘成运, 张香兰. 云南山茶雌雄配子体的发育 [J]. 云南植物研究, 1983, 5(2): 401-408.
- [15] 李天庆, 曹慧娟. 金花茶种子早期发育的胚胎学研究 [J]. 北京林业大学学报, 1986, 2: 43-47.
- [16] 李天庆, 曹慧娟. 金花茶小孢子囊、小孢子和雄配子体的发育 [J]. 北京林业大学学报, 1986, 2: 30-35.
- [17] 李坤季, 杨貌仙. 金花茶小孢子的发生和雄配子体的形成 [J]. 云南大学学报, 1986, 8(3): 302-308.
- [18] TSOU C H. Embryology of Theaceae-anther and ovule development of *Camellia*, *Franklinia* and *Schima* [J]. American Journal of Botany, 1997, 84(3): 369-381.
- [19] 杨世雄, 彭华, 梁汉兴. 毛果猴子木的胚胎学观察及山茶属胚胎学特征比较 [J]. 广西植物, 2002, 22(4): 340-344.
- [20] 敖成齐. 毛叶茶大小孢子的发和雌雄配子体的发育 [J]. 茶叶科学, 2004, 24(1): 37-40.
- [21] 秦慧贞, 李碧媛. 鹅掌楸雌配子体败育对生殖的影响 [J]. 植物资源与环境, 1996, 5(3): 1-5.
- [22] 何田华, 饶广远, 尤瑞麟. 濒危植物木根麦冬的胚胎学研究 [J]. 植物分类学报, 1998, 36(4): 305-309.
- [23] 张寿洲, 潘开玉, 张大明, 等. 矮牡丹小孢子母细胞减数分裂异常现象的观察 [J]. 植物学报, 1997, 39(5): 397-404.
- [24] 王仲礼, 刘林德, 田国伟, 等. 短柄五加开花后雌蕊的发育状态与受精作用的研究 [J]. 植物学报, 1998, 40(4): 309-315.
- [25] 王兰, 任一龙. 大头茶的大小孢子发生及雌雄配子体发育 [J]. 西南师范大学学报, 1987(4): 127-133.
- [26] 杨世雄, 闵天禄. 山茶科核果茶属和石笔木属的胚胎学研究 [J]. 云南植物研究, 1995, 17(1): 67-71.
- [27] 高润梅. 珍稀濒危植物的胚胎学研究进展 [J]. 山西农业大学学报, 2002, 22(3): 239-245.

【责任编辑 李晓卉】

【责任编辑 李晓卉】

(上接第 71 页)