

PCR-DGGE 指纹技术在食品微生物研究中的应用

高蕙文, 吕欣, 董明盛*

(南京农业大学食品微生物实验室, 江苏 南京 210095)

摘要: 分子生物学的发展带动了实验技术的进步, DGGE 作为一种不依赖于培养的分子技术最近被用于食品微生物的研究。本文简要介绍了 DGGE 基本原理, 及其在微生物鉴定, 种群多样性研究和发酵过程动态监测中的应用, 并对该技术自身存在的缺陷进行了评价。

关键词: PCR-DGGE; 食品微生物学; 微生物多样性

Application of PCR-DGGE Fingerprinting in Food Microbiology

GAO Hui-wen, LÜ Xin, DONG Ming-sheng*

(Food Microbiology Laboratory, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: The development of Molecule Biology brings along the improving of experimental technology. DGGE is used in the study of food microbiology as a non-culture method. The principle in this paper is summarized, and the application in several fields of food microbiology are reviewed: the identification of microorganisms, the evaluation of microbial diversity, and monitoring during food fermentation. Limitations of this approach are also indicated

Key words: PCR-DGGE; food microbiology; microbial diversity

中图分类号: Q7

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2005)08-0465-04

长期以来, 人们对微生物的认识大多是通过纯培养, 或者是利用显微镜直接进行形态观察, 对生态系统中微生物种群多样性及群落结构的研究也是采用经典的分离培养和鉴定的方法。但是这些手段和技术对于微生物及微生物生态的研究是远远不够的。其中很重要的一个原因是人们无法准确了解自然生境中微生物生长的真实条件, 难以设计出一种接近其自然生长条件的培养基, 无法获得纯培养物。据人们推测自然界中有 85%~99% 的微生物至今还不可培养^[2], Suau 等人的研究结果也表明, 人类肠道中有 60%~80% 的微生物是不能够通过培养进行研究的^[1], 这给人们客观认识环境中微生物存在的状况造成了严重的障碍。

遗传指纹技术是一种不依赖于培养的分子技术, 它依据独特核酸物质的分离提供微生物群落多样性的谱带, 目前已广泛应用于自然生态系统中微生物的鉴定和监测。1993 年 Muyzer 等人首次将变性梯度凝胶电泳(即

DGGE)用于微生物生态学研究, 后来 PCR-DGGE 在环境微生物学中的应用有了大量报道。但直到最近才有人将其技术应用于食品微生物学和发酵食品研究中。本文主要介绍了 DGGE 的基本原理以及它在食品中微生物群落分析中的应用。此外, 还讨论了该技术的不足之处, 并就其在食品微生物中的应用前景作了展望。

1 DGGE 的技术原理

DGGE 是一种可将长度相同但序列不同的 DNA 片段分离开的电泳方法。Fisher 和 Lerman 早在 1983 年就其分离机理作了阐述。其原理是: DNA 分子中四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 分子在含有变性剂(尿素和甲酰胺)的聚丙烯酰胺凝胶中电泳时, 因解链行为不同, 使不同序列的 DNA 片段滞留于凝胶的不同位置,

收稿日期: 2005-04-28

* 通讯作者

基金项目: 国家科技攻关计划(2002BA518A12); 国家(863)高技术研究发展计划(2002AA248041);

江苏高技术研究发展计划(BJ2002322)

作者简介: 高蕙文(1981-), 女, 硕士研究生, 研究方向为食品微生物学与生物技术。

形成相互分开的谱带。理论上认为,只要选择的电泳条件如变性梯度、电泳时间、电压等足够精细,有一个碱基差异的DNA片段都可以被分开。因此我们可以由某一环境中微生物的总DNA得到样品中原始菌群的指纹图谱,从而了解生境中微生物的种类,结构和分布。

2 PCR-DGGE 在食品微生物研究中的应用

2.1 食品中微生物的分离和鉴定

不同菌种的16SrDNA可变区含有不同的碱基对,我们可以以此为靶基因用PCR-DGGE进行区别。2001年Ampe分析了16S rDNA上的V3可变区并用PCR-DGGE确定了酸木薯淀粉发酵过程中的乳酸菌(包括*Streptococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*和*Leuconostoc*等)。同年Ercolini用PCR-DGGE分析了水牛莫泽雷勒干酪发酵剂中所含的微生物^[5],通过16S rDNA的V3可变区鉴定了其中嗜热和嗜温的乳酸菌。2003年,Guerrini通过对比扩增的V3可变区和标准条带的迁移度鉴别了发酵香肠中的*Oenococcus oeni*乳酸菌。同年,Pepe鉴定了发酵面包中存在的芽孢杆菌;Blaiotta等也用同样的方法鉴定了腊肠中的葡萄球菌^[6]。虽然16S rDNA是进行系统分析常用的工具基因,但它也有一定的不足,比如,它是一种多拷贝的基因,由于突变的存在势必会使这些拷贝体之间存在差异。1999年,Fogel发现高分辨率的DGGE凝胶上同一种菌出现了多条带,而不是理论上的一条带^[6],这种误差给研究者带来了一定困难,因此人们开始寻找可替代16S rDNA的新靶点。

许多功能基因常用于菌种的鉴别。*Rpo B*(RNA多聚酶 β 亚基)是细菌中普遍存在的基因,它在进化过程中相对保守,并存在种属特异性的可变区,而且它是单拷贝的,不会在DGGE凝胶上出现多条带^[6]。2003年有人用*rpo B*成功的鉴别了巴尔通氏体属(*Bartonella*)的多种菌^[8]。转醛酶基因在双歧杆菌的检测和鉴定中也较为重要,Requena等用ForTal、RevTal-GC引物对双歧杆菌转醛酶基因进行PCR-DGGE,鉴别了长双歧杆菌的两种亚型、假链状双歧杆菌的两种亚型、青春双歧杆菌的五种亚型,而且都表现出了很高的敏感性^[4]。人们发现乳酸菌中LacS基因比LacZ基因存在更多的种属差异,用LacS进行序列分析甚至可将微生物鉴定到株的水平^[7]。2004年Danilo Ercolini等人用该基因结合PCR、SSCP以及DGGE鉴别出17株嗜热链球菌。此外,Cocolin等人还以*iap*(入侵蛋白基因)为靶基因,用DGGE分离并鉴定了五种李斯特菌^[5],为快速检测食品中的李斯特菌提供了新思路。2001年Farnleitner用功能性*uidA*基因分离鉴别了水中不同的大肠杆菌^[9]。

2.2 食品发酵过程中微生物群落动态监测

1999年Ampe发表了一篇关于墨西哥发酵玉米面团

(pozol balls)中微生物空间分布的文章。他结合DGGE和16S rDNA杂交结果分析,获知样品中微生物种群的有意义信息,并推知乳酸菌在pozol面团发酵过程中可能的作用。而且他采用培养和非培养结合的方法鉴定了其中的10种菌。2000年Ben Omar和Ampe从种群动力学的角度对发酵面团作了进一步的研究,确定了各个发酵阶段的优势菌,阐明了其种群的演变。研究表明*Streptococcus spp*在整个发酵过程中都是优势菌,而异型发酵乳酸菌如*Lactobacillus fermentum*只存在于发酵的起始阶段,随后就被同型发酵乳酸菌(*Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei*和*Lactobacillus delbrueckii*)所代替。同时,他们还发现了粪源(*Bifidobacterium*和肠球菌)的存在^[5]。2003年Miambi证明*Lactobacillus manihotivorans*, *L. fermentum*和*Lactobacillus crispatus*只能用DGGE进行鉴定,而不能用培养的方法进行鉴定。

传统的英国干酪上聚居着复杂的微生物群落,包含有*Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus. lactis*, *Staphylococcus equorum*, *Enterococcus faecalis*和*Leuconostos mesenteroides*等。2003年Ercolini以16S rDNA中V3、V4、V5区为靶用PCR-DGGE分析,并根据变性凝胶电泳上回收的DNA序列设计了用于荧光原位杂交探针,鉴定了斯提耳顿干酪中的微生物菌群,并进一步研究了干酪表面到中心细菌的空间分布。2002年Randazzo用16S rRNA转录PCR-DGGE对该干酪中进行了活菌分析。2002年Randazzo研究了斯提耳顿干酪手工生产过程中菌群的交替。他选用16S rDNA的V6-V8可变区来分析整个干酪生产过程中的菌群变化,并采用特异性探针,反转录乳酸杆菌的V1-V3区来监测每一过程的活菌情况。干酪生产过程中所有样品的DGGE图谱反映了整个过程中微生物群落结构的剧烈演变。

Cocolin等人将DGGE应用于意大利自然发酵肠成熟过程中微生物菌群动力学研究。16S rDNA的V1区可用于肉品中菌相的分析^[5],经PCR或RT-PCR扩增,再用DGGE电泳便可获得相应的指纹图谱,实验表明乳酸菌是发酵肠成熟早期优势菌,其中*Lactobacillus sake*和*Lactobacillus. curvatus*对产品的酸化和蛋白质的水解有重要作用,决定了发酵肠的感官品质。

发酵型和非发酵型饮料也可以用这种方法进行研究。2002年Beek和Priest研究了Malt whisky发酵过程中乳酸菌的情况。他们扩增了16S rDNA中的V3区进行DGGE电泳,又对V6—V8区采用RT-PCR-DGGE分析,结果表明:*Lactobacilli*是发酵过程中起重要作用的菌,而同型发酵菌*Lactobacilli acidophilus*和*Lactobacillus crispatus*在发酵过程的后期占主导地位。Van Beek和Priest(2002年)通过采用16S rDNA上V6-V8可变

区为靶目标优化了 DGGE 对 *Lactobacilli* 的分离。

2004 年, Jung-Sook Lee, Gun-Young Heo 等人用 gc338f 和 518r 为引物扩增了 16S rDNA 的 V3 区, 并用 PCR-DGGE 进行分析, 实验表明, 乳酸菌在 kimchi(一种韩国泡菜)发酵中具有重要作用。而且人们发现 10℃ 和 20℃ 培养制作的 kimchi 中菌相组成相似, 其中 *Weissella confusa* 和 *Leuconostoc citreum* 存在于发酵的整个阶段, *Lactobacillus sakei* 和 *Lactobacillus curvatus* 则是样品中的优势菌^[11]。

2.3 标准模型的建立

将食品中常见的有代表性的各种菌进行 16S rDNA 扩增, 这些扩增子可作为 DGGE 电泳的标准条带。将食品中直接提取的 DNA 扩增产物和作为参考阶梯的标准扩增子一起进行 DGGE 凝胶电泳, 通过比较 PCR 扩增子和标准条带在图谱中的迁移距离, 我们可以对菌进行鉴定。2001 年 Coppola 建立了 DGGE 图谱中鉴定 Pasta filata cheeses 中微生物的扩增子的标准图谱。2002 年, Van Beek 和 Priest 用同样的方法鉴定了 Malt whisky 中的微生物。2003 年 Fasoli, Temmerman 分别建立了鉴定酸奶和益生菌制剂所含菌种的标准图谱^[5]。同年, Meroth 用此标准图谱鉴定了酸面团发酵过程中的细菌。虽然这种建立标准模型的方法比基因测序简单, 但因为有其固有的缺陷, 因而并不能保证鉴定的准确性。如 16S rDNA 的多拷贝, DGGE 条带的间距不宽等, 这些都会使鉴定不准确。用标准条带进行 DGGE 分析有助于利用软件对电泳进行规范化, 据 Temmerman 介绍, 将每条带的位置收集、记录, 建立数据库, 可对变性梯度相同的不同 DGGE 胶的对比分析。这对有大量样品进行大量分析非常有用。

2.4 食品质量监测与控制

从食品基质中直接提取微生物的 DNA 进行 PCR-DGGE 分析, 可获得当时环境中食品的相关信息。由此得到的指纹图谱则反映了食品中微生物的真实情况, 它可作为食品的一项特殊性质, 与生化结构或感官特性并列, 因此该法可作为鉴定食品生物特性和控制食品质量的有效工具。

2003 年 Mauriello 将 PCR-DGGE 用于食品的分类, 文中他分析了来自意大利南部不同地区水牛莫泽雷勒干酪生产中的发酵剂。由指纹图谱我们可以看出发酵剂中微生物的组成与地理来源有很大的关系。同一地区样品中的发酵剂其 DGGE 图谱很相似, 而且实验表明每种发酵剂在凝乳成熟过程中潜在的风味物质与 DGGE 图谱中所反应的微生物的复杂性及产品产地有关。2001 年 Coppola 比较了工业化生产和手工生产的 pasta filata 干酪的 DGGE 图谱, 传统的 pasta filata cheeses 的 DGGE 图谱中条带的丰度很大, 而工业化生产的产品微生物多样

性则明显下降。于是他提出 PCR-DGGE 可作为区分工业和手工干酪快速而有效的方法。PCR-DGGE 指纹图谱还可用于追踪传统水牛莫泽雷勒干酪形成过程中的动力学。对中间产物进行图谱分析可检测自然发酵剂的效用, 确定发酵过程中各种乳酸菌对产品最终成型的作用。2004 年 J.Theunissen 和 T.J.Britz 等人对南非益生菌食品进行了抽样检查, 他们用 DGGE 法确认了食品中的微生物, 并与标签进行了核实, 结果表明: 只有 54.5% 的酸奶含有标签上所注的菌, 而益生菌制剂的合格率只有三分之一^[10]。除此该法还可用于检测矿泉水的卫生质量, 肉品中存在的腐败菌。因此 PCR-DGGE 相对于传统方法而言, 在控制食品的质量(主要指所含菌的种类和数量)方面潜力巨大。

3 PCR-DGGE 技术的局限性

任何方法都有一定的偏差, 分子技术虽然可以避免传统方法的不足但也有其自身的缺陷。首先它在制样和样品处理的过程中就已经产生了偏差, 清洗、混匀、冷冻或离心等步骤严重影响了食品中微生物的生存, 造成菌种的改变或菌数的变化。DNA 的抽提更会导致对食品中微生物的选择, 而且菌数的不同也会影响 DNA 的提取浓度和检测限。另外食品基质(脂类、蛋白质、碳水化合物、盐类)越复杂, 抽提就越困难, 去杂就越不容易, 而这些残存的杂质很可能成为抑制剂影响 PCR 的扩增。所以我们首先要对 DNA 的提取进行优化, 提高抽提率及 DNA 产物的纯度。

PCR 技术本身也存在不足, 1992 年 Reysenbach 发现用 rDNA 基因在 PCR 过程中会产生优先扩增现象, 只扩增部分细菌的 DNA, 造成了群落中原始成员的减少。另一个问题就是嵌合体的形成或异源双链的产生。它会影响 DGGE 图谱中条带的分布。

DGGE 只能分离较小的片段(1kb 以下), 较长的片段分离率下降, 这就限制了系统发育分析和探针的序列信息量^[9]。其次, 若选用的条件不是特别适宜, DGGE 并不能保证可以将有一定序列差异的 DNA 片段完全分开, 可能会出现不同序列 DNA 的共迁移现象。再者, 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, 从而高估了样品中微生物的多样性。DGGE 另一个突出问题是关于分辨率和检测限的问题。通常该法只能检测到优势菌的存在。Muyzer 的研究表明, 只有占整个群落细菌数量约 1% 或以上的类群能被检测到。事实上, 检测限和食品中菌的浓度也有很大关系, 该法的检测范围一般为 $10^4 \sim 10^8$ cfu/ml。检测限度也取决于具体的菌种或菌株。一般微生物群落中其他成员的浓度和数量也会影响目标菌的检测限, 因为它们可影响 DNA 的抽提率, 并在 PCR 扩增时竞争模板。

4 展 望

PCR-DGGE 在食品微生物中的应用前景巨大。它可快速监测食品成熟阶段微生物的情况,评价产品中微生物的群落,并可根据环境变化分析食品中菌群的动力学。除此,人们还可以用此项技术对发酵过程中菌的变化,芳香成分的产生,产品质地的形成进行研究,了解发酵过程中特定菌的真实作用。

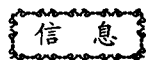
DGGE 在监测食品发酵,控制食品质量方面具有重要作用。它可分别对原料、中间产物和终产品的质量进行评估,准确地对生产过程进行控制,而且它还可以用于快速检测微生物引酵物的效用,研究整个发酵过程的动力学。这些都将有助于我们调整工艺,规范技术,保证食品的质量。另外,该技术还有一个潜在的应用是对食品的追踪溯源,通过分析食品中的菌相我们可以鉴别某些食品的原始产地,从而达到控制食品质量,防止假冒伪劣的目的。

近年来,许多科学家都在研究如何克服该项技术本身的缺陷,如优化分析条件,采用不同的靶基因,与其他技术的相辅相成等等,使其尽可能为我们提供有关微生物的完整可靠的信息。但是由于我们的经验不足,PCR-DGGE 还不能成为工业上一种有效的控制手段,它是否适于大规模生产中大量样本量的常规分析还有待进一步研究。

参考文献:

[1] 付琳林,李海星,等.利用变性梯度凝胶电泳分析微生物的多样性[J].生物技术通报,2004,(2):38-40.

- [2] 柴丽红,等. DGGE 技术在微生物生态学研究中的应用. 中国期刊网.
- [3] 马悦欣. 变性梯度凝胶电泳(DGGE)在微生物生态学中的应用[J]. 生态学报, 2003, 23, (8):1561-1569.
- [4] 楼金玕. 分子生物学技术在肠道正常菌群研究中的应用[J]. 国外医学儿科学分册, 2004,31(1):1-4.
- [5] Danilo Ercolini. PCR-DGGE fingerprinting: novel strategies for detection of microbes in food[J]. Journal of Microbiological Methods, 2004, 56:297-314.
- [6] Kalliopi Rantsiou, Giuseppe Comi, Luca Cocolin. The *rpoB* gene as a target for PCR-DGGE analysis to follow lactic acid bacterial population dynamics during food fermentations[J]. Food Microbiology, 2004,21:481-487.
- [7] Danilo Ercolini, et al. Sequence heterogeneity in the *lacSZ* operon of *Streptococcus thermophilus* and its use in PCR systems for strain differentiation[J]. Research in Microbiology, 2004, 1-12.
- [8] Bernard La Scola. Gene-sequence-based criteria for species definition in bacteriology: the *Bartonella* paradigm[J]. TRENDS in Microbiology, 2003, 11 (7):318-321.
- [9] Cynthia L. Meays. Source tracking fecal bacteria in water: a critical review of current methods[J]. Journal of Environmental Management, 2004, 73: 71-79.
- [10] J Theunissen. Identification of probiotic microorganisms in South African products using PCR-based DGGE analysis [J]. International Journal of Food Microbiology, 2005,98: 11-21.
- [11] Jung-Sood Lee, et al. Analysis of kimchi microflora using denaturing gradient gel electrophoresis[J]. International Journal of Food Microbiology, 2005.



新加坡研制成诊断癌症的纳米工具

新加坡国立大学的科研人员利用天然聚合物研制成功可以诊断癌症、又可杀死癌细胞的纳米工具。

据新加坡《联合早报》日前报道,负责这项研究工作的国大生物工程系助理教授张勇表示,这种利用天然聚合物制成的纳米颗粒具备了适合生物体、有生物功能和可生物降解三种特性。

这种纳米颗粒的直径不超过 100 纳米,科学家在颗粒里面装载诸如量子点、药物、磁性颗粒等各种物质,使这种纳米颗粒成为诊断癌症和杀死癌细胞的工具。

报道说,量子点受到光源照射时会发光,不同大小的量子点发出不同颜色的光,发光时间可维持几个小时,甚至几天。装载了量子点和药物的纳米颗粒被癌细胞吸收后,经光源照射,科研人员就可辨认哪些细胞是癌细胞,同时把癌细胞杀死。