

# 应用聚合酶链式反应-变性梯度凝胶电泳和 16S rDNA 技术分析果冻胀气原因

严琼英, 林霖, 叶秀玲, 陈晶, 黄建飞, 刘丛丛, 杨国武\*, 兰全学  
(深圳市计量质量检测研究院, 深圳 518131)

**摘要:** **目的** 分析某品牌果冻胀气的原因。**方法** 提取胀气果冻总 DNA, 采用聚合酶链式反应-变性梯度凝胶电泳技术(polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis, PCR-DGGE)进行菌群结构分析, 同时采用平板分离法从果冻中分离细菌。并将分离得到的菌株进行 16S rDNA 扩增和测序比对分析。将分离的菌株接种到正常果冻中进行产气实验。**结果** PCR-DGGE 和平板分离结果表明, 在胀气果冻中分别只检测到一种细菌, 未检测出真菌。测序比对结果表明该细菌属于芽孢乳杆菌属。将该菌接种到正常果冻中会引起果冻胀气。**结论** 芽孢乳杆菌是导致该品牌果冻胀气的主要因素。

**关键词:** 胀气果冻; 芽孢乳杆菌; 16S rDNA; 聚合酶链式反应-变性梯度凝胶电泳

## Analysis of swollen jelly by polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis and 16S rDNA techniques

YAN Qiong-Ying, LIN Lin, YE Xiu-Ling, CHEN Jing, HUANG Jian-Fei, LIU Cong-Cong,  
YANG Guo-Wu\*, LAN Quan-Xue

(Shenzhen Academy of Metrology and Quality Inspection, Shenzhen 518131, China)

**ABSTRACT: Objective** To analyze the reason of swollen brand jelly. **Method** Total microbial community genome were extracted from swollen and normal jelly and analyzed by polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis (PCR-DGGE). Bacteria was isolated by traditional plate technique and the 16S rDNA of isolated bacteria was amplified and sequenced. Observation the production of gas by inoculating the isolated strain into normal jelly. **Result** Both the DGGE profile and plate technique result revealed that only one species of bacteria could be detected, fungus was not detected. The result of sequence blasting showed that the strain fell within the genus *Sporolactobacillus*. The strain resulted in production of gas when it was inoculated into normal jelly and cultivated for 7 d. **Conclusion** The result indicated that *Sporolactobacillus* played the key role in the swollen brand jelly.

**KEY WORDS:** swollen jelly; *Sporolactobacillus*; 16S rDNA; polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis

\*通讯作者: 杨国武, 教授级高工, 主要研究方向为食品生物化学。E-mail: yangguowu@smq.com.cn

\*Corresponding author: YANG Guo-Wu, Professor Level Senior Engineer, Shenzhen Academy of Metrology and Quality Inspection, Minkang Road, Longhua New District, Shenzhen 518131, China. E-mail: yangguowu@smq.com.cn

## 1 引言

果冻是一种由食用明胶、水、糖等原料,经过溶胶、调配、灌装、杀菌、冷却等工艺加工制成的半固体甜食,外观晶莹、口感软滑、色泽鲜艳、清甜滋润,是深受妇女和儿童喜爱的一种低热量、高膳食纤维的健康食品<sup>[1]</sup>。我国于1985年首次引进第一条果冻生产线,随着需求的日益增加,果冻行业在我国逐渐形成了产业,并且超越日本成为了亚洲最大的生产国和销售国<sup>[2]</sup>。现有某大型果冻生产企业为保持水果果冻中水果原有的口感、风味以及减少水果中维生素等营养成分的损失,采用新工艺生产了一批果冻,部分果冻在储存一段时间后出现胀气现象,影响果冻外观,影响企业经济效益,更重要的是对食品存在一定的安全隐患,因此找出果冻胀气的原因刻不容缓。变性梯度凝胶电泳(denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE)是研究微生物菌群结构及亲缘关系的主要分子工具,它不依赖于细菌的培养即可进行分析,大大节省了分析时间并防止遗漏环境中不可培养菌的遗传信息,该技术迅速扩展到许多领域<sup>[3,4]</sup>。理论上它能将大小相同碱基序列不同的条带加以区分,单个碱基差异的DNA片段都能被区分为不同的条带<sup>[5,6]</sup>,再结合16S rDNA序列分析技术,即可鉴定出菌种。本实验应用PCR-DGGE和16S rDNA技术及传统培养技术综合分析引起果冻胀气

的原因。

## 2 材料与方法

### 2.1 样品及处理

某品牌同批次胀气果冻和正常果冻,采用无菌操作取样并立即进行分析,剩余样品放置4℃冰箱保存。

### 2.2 主要试剂和引物

细菌和真菌基因组提取试剂盒、DNA回收纯化试剂盒均购自深圳太太基因工程有限公司,Prime STAR聚合酶、质粒pMD18-T和DNA Marker均由Takara公司提供,革兰染色液购自珠海贝索有限公司,马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA)购自北京陆桥、GYE琼脂(葡萄糖1.0%、蛋白胨0.3%、酵母粉0.7%、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>0.1%、MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O0.05%、琼脂粉1.5%),引物由上海生物工程有限公司合成(见表1),其他化学试剂为分析纯。

### 2.3 PCR-DGGE 菌群结构分析

#### 2.3.1 样品处理和基因组DNA提取

分别取25g胀气果冻和正常果冻,加入225mL无菌生理盐水,匀浆制成10倍样品稀释液,取10mL样品稀释液800r/min离心2min,取上清液12000r/min离心5min,用细菌和真菌基因组DNA提取试剂盒提取基因组DNA作为后续PCR反应模板。

表1 实验中常用引物  
Table 1 Primers used in this study

引物	序列(5'→3')
27F	AGAGTTTGATCTGGCTCAG
1492R	GGTACCTTGTTACGACTT
GC-338F	CGCCC GCCGCGCGCGGGCGGGGCGGGGCACGGGGGG GACTCCTACGGGAGGCAGCAG
518R	ATTACCGCGGCTGCTGG
338F	CCTACGGGAGGCAGCAG
NS1	GTAGTCATATGCTTGTCTC
FR1	AICCATCAATCGGTAIT
GC-NS3	CGCCC GCCGCGCGCGGGCGGGGCGGGGCGGGGCACGGGGGGGC AAGTCTGGTGCCAGCAGCC
YM951r	TTGGCAAATGCTTTTCGC

### 2.3.2 PCR-DGGE 分析

以总 DNA 为模版, 利用引物 27F/1492R<sup>[7]</sup>和引物 NS1/FR1<sup>[8]</sup>扩增出整个 16S rDNA 和 18S rDNA 序列。再分别以 16S rDNA 序列为模版, 引物 GC-338F/518R<sup>[9]</sup>扩增出细菌的 V3 区; 以 18S rDNA 序列为模版, 引物 GC-NS3/YM951r<sup>[10]</sup>扩增真菌的特殊片段。扩增产物采用浓度为 8% 丙烯酰胺/双丙烯酰胺 (37.5:1, V:V) 胶, 选择优化好的 20%~60% 变形梯度凝胶进行 DGGE 分离<sup>[11,12]</sup>, 电泳条件为 60 °C, 120 V, 6 h, 采用 EB 进行染色。将目的条带切胶回收并以此为模板采用同样的程序再次跑 DGGE 胶直至形成单一的条带, 将条带连接载体 pMD18 中并送去测序, 测序结果在 NCBI 上进行 BLAST 序列分析。

## 2.4 传统培养和 16S rDNA 序列分析

### 2.4.1 传统培养

取上述 2.3.1 匀浆制成的 10 倍样品稀释液, 涂布在 PDA 琼脂平板、GYP 琼脂平板上分别在 28 °C、37 °C 进行需氧、微需氧、厌氧培养 7 d, 将分离菌株在上述培养基上纯化培养并进行革兰氏染色观察。

### 2.4.2 用细菌基因组 DNA 试剂盒提取分离菌株

得到的基因组 DNA 用 16S rDNA 通用引物 27F 和 1492R 进行 PCR 扩增, 反应程序为: 94 °C 预变性 5 min, 94 °C 变性 30 s, 54 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 35 个循环, 最终 72 °C 延伸 10 min。将 16S rDNA 片段回收纯化连接到载体 pMD18 中并送去测序, 测序结果在 NCBI 上进行 BLAST 序列分析。

## 2.5 果冻胀气验证试验

用 2 mL 无菌注射器吸取 200 μL 分离菌株的 GYP 新鲜增菌液(细菌浓度约为 10<sup>7</sup> cfu/mL), 注入正常的果冻中, 同时用另一无菌注射器吸取 200 μL 无菌生理盐水做阴性对照, 分别注射 3 个正常果冻, 并立即密封果冻上的针孔, 确保果冻内无气泡后放置在 37 °C 培养箱培养 7 d, 观察果冻胀气情况。

## 3 结果与分析

### 3.1 PCR-DGGE 菌群结构分析

经 16S rDNA V3 区 PCR-DGGE 电泳后, 胀气果冻对应泳道只发现一条亮带, 正常果冻对应泳道没有亮带, 如图 1 所示; 经过 18S rDNA PCR-DGGE 电泳后, 未检测到真菌条带。结果提示胀气果冻中菌群结构较单一, 只含有一种细菌。经切胶回收连接载体

pMD18 中并送去测序, 测序结果进行 BLAST 比对后, 序列登录号为: KP340805, 结果显示与芽孢乳杆菌的亲缘性最高。

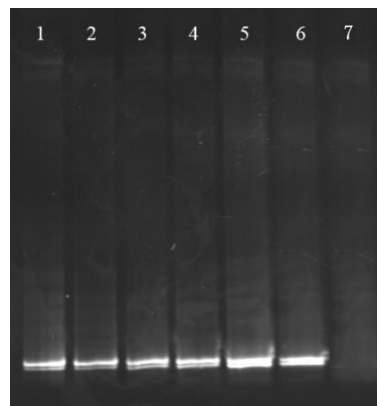


图 1 16S rDNA V3 区 PCR-DGGE 指纹图谱

Fig. 1 PCR-DGGE profiles of bacterial 16S rDNA of V3 fragment

注: 泳道 1-6 为同批次的 6 个胀气样品, 泳道 7 为正常果冻

### 3.2 传统培养和 16S rDNA 序列分析

经过 7 d 培养, PDA 琼脂平板上均无菌落生长; GYP 琼脂平板上, 需氧条件培养均无菌落生长, 微需氧、厌氧条件培养, 不同胀气果冻的平板均有细菌生长, 形态单一, 正常果冻中未见菌落生长。该菌株在 GYP 培养基上生长良好, 形态为白色、光滑、凸起、湿润的单个菌落(如图 2)。镜检结果为革兰氏阳性杆状, 单个排列或成链排列, 菌体大小为 0.6×6~10.5 μm(如图 3)。通过 16S rDNA 序列分析并 BLAST 比对发现分离的菌株属于芽孢乳杆菌属, 但又与其他种类不同, 序列比对结果见表 2。

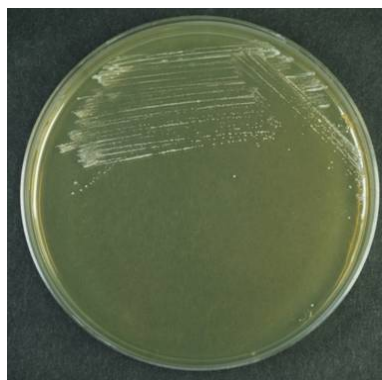


图 2 胀气果冻分离菌株

Fig. 2 Strain from swollen jelly

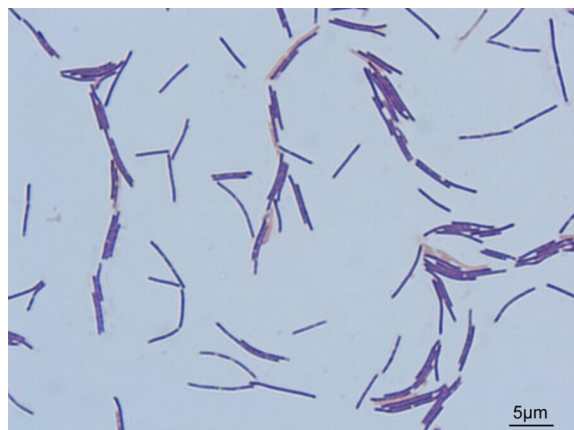


图3 革兰氏染色镜检图(放大倍数: 10×100)

Fig. 3 Gram staining microscopy of strain

表2 16S rDNA 序列比对结果

Table 2 Identification results of bacteria by 16S rDNA sequence analysis

相似菌株	登陆号	相似度%
<i>Sporolactobacillus vineae</i>	EF581819	97.46
<i>Sporolactobacillus putidus</i>	AB374522	96.91
<i>Sporolactobacillus inulinus</i>	AB362770	95.96
<i>Sporolactobacillus terrae</i>	AJ634662	95.85
<i>Sporolactobacillus kofuensis</i>	AJ634661	95.58

### 3.3 果冻胀气验证试验

注入分离菌株的正常果冻, 放置 7 d 后, 均出现胀气现象; 而只注入无菌生理盐水的果冻未出现胀气, 表明该菌株在果冻内生长繁殖可引起果冻胀气。

## 4 讨论

经过 PCR-DGGE、16S rDNA 序列分析和传统培养方法, 只从胀气果冻中鉴定到一种菌, 为芽孢乳杆菌。1963 年, Kitahara 等<sup>[13]</sup> 采用 GYP 培养基首次从家禽饲料中分离到了菊糖芽孢乳杆菌, 并因此建立芽孢乳杆菌属。芽孢乳杆菌是一种革兰氏阳性杆状, 产芽孢, 过氧化氢阴性, 产乳酸的细菌<sup>[14]</sup>。许多特征与乳酸杆菌(*Lactobacillus*)类似, 无糖培养基上不生长。目前芽孢乳杆菌含有 7 个种和 2 个亚种。通过 16S rDNA 比对分析发现该菌与葡萄园芽孢乳杆菌 *Sporolactobacillus vineae* SL153<sup>T</sup>(EF581819)<sup>[15]</sup> 模式菌 16S rDNA 序列同源性最高, 为 97.43%, 同其属内其余菌株 16S rDNA 序列同源性均为 95%到 97%之间,

*S.putidus* QC81-06<sup>T</sup>(96.91%)<sup>[16]</sup>, *S.inulinus* NRIC 1133<sup>T</sup>(95.96%), *S.terrae* DSM 11697<sup>T</sup> (95.85%)<sup>[17]</sup>, 有可能为芽孢乳杆菌属内一个新种, 但菌株相关性有待进一步研究。

本实验中, 将胀气果冻中分离到的芽孢乳杆菌重新注入正常果冻, 经培养能引起果冻胀气, 表明芽孢乳杆菌的生长繁殖是导致本次研究果冻胀气的主要原因。目前, 芽孢乳杆菌大多分离自鸡饲料、根际土壤、土壤、发酵引子和变质的果汁等, 本次研究胀气果冻中分离的芽孢乳杆菌可能来源于水果原料。该菌在果冻中生长繁殖, 导致果冻胀气。该企业可在以后的果冻生产中, 推行采用 HACCP 体系, 监控加工过程中的关键环节, 使食品安全危害风险降低到最小或可接受的水平, 预测和防止在食品生产过程中出现影响食品安全的危害。

### 参考文献

- [1] 马桂兰. 海参果冻的加工工艺及熟制海参劣化机理的初步探讨[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2012  
Ma GL. Processing of sea cucumber jelly and study of cooked sea cucumber deterioration mechanism abstract [D]. Qingdao: Ocean University of China, 2012.
- [2] 吴初旭. 基于波特模型的国内果冻业发展研究[J]. 合作经济与科技, 2009, (16): 10-11  
Wu CX. Based on domestic jelly industry development research of porter model [J]. Co-Operative Econ Sci, 2009, (16): 10-11.
- [3] Muyzer G, Smalla K. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology [J]. Anton Leeuw, 1998, 73(01): 127-141
- [4] Muyzer G. DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystem [J]. Curr Opin Microbiol, 1999, 2: 317-322
- [5] Fischer SG, Lerman LS. DNA fragments differing by single base-pair substitutions are separated in denaturing gradient gels: correspondence with melting theory [J]. Biochemistry, 1983, 80: 1579-1583
- [6] Myers RM, Fisher SG, Lerman LS, 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, 13:3131-3145
- [7] Kim TW, Lee JH, Kim SE, et al. Analysis of microbial communities in doenjang, a Korean fermented soybean paste, using nested PCR-denaturing gradient gel electrophoresis [J]. Int J Food Microbiol, 2009, 131:265-271
- [8] Vainio EJ, Hantula J. Direct analysis of wood-inhabiting fungi using denaturing gradient gel electrophoresis of amplified

- ribosomal DNA [J]. Mycol Res, 2000, 104:927-936.
- [9] Muyzer G, Waal EC, Uitterlinden AG. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA [J]. Appl Environ Microb(AEM), 1993, 59(3): 695-700
- [10] 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]. Int J Food Microbiol, 2006, 109: 79-87.
- [11] 刑德峰, 任南琪, 宋佳秀, 等. 不同 16SrDNA 靶序列对 DGGE 分析活性污泥群落的影响[J]. 环境科学, 2006, 7(27): 1424-1428  
Xing DF, Ren NQ, Song JX. Community of activated sludge based on different targeted sequence of 16S rDNA by denaturing gradient gel electrophoresis [J]. Environ Sci, 2006, 7(27): 1424-1428.
- [12] 刘飞. PCR-DGGE 技术分析多菌态混合样品中微生物群落结构[D]. 广州: 华南理工大学, 2012  
Liu F. Microbial community structure analysis in different mixed microbial samples by PCR-DGGE technology [D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2012.
- [13] Kitahara K, Suzuki J. *Sporolactobacillus* nov. subgen [J]. J Gen Appl Microbiol, 1963, 9(1): 59-71
- [14] Doores S, Westhoff D. Heat resistance of *Sporolactobacillus inulinus* [J]. Int J Food Microbiol, 1981, 46(3): 810-812
- [15] Chang YH, Jung MY, Park IS, *et al.* *Sporolactobacillus vineae* sp. nov., a spore-forming lactic acid bacterium isolated from vineyard soil [J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2008, 58(10): 2316-2320
- [16] Fujita R, Mochida K, Kato Y, *et al.* *Sporolactobacillus putidus* sp. nov., an endospore-forming lactic acid bacterium isolated from spoiled orange juice [J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2010, 60(7): 1499-1503
- [17] Yanagida F, Suzuki KI, Kozaki M, *et al.* Proposal of *Sporolactobacillus nakayamae* subsp. *nakayamae* sp. nov., subsp. nov., *Sporolactobacillus nakayamae* subsp. *racemicus* subsp. nov., *Sporolactobacillus terrae* sp. nov., *Sporolactobacillus kofuensis* sp. nov., and *Sporolactobacillus lactosus* sp. Nov [J]. Int J Syst Evol Microbiol, 1997, 47(2): 499-504

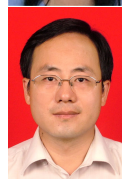
(责任编辑: 金延秋)

## 作者简介



严琼英, 工程师, 主要研究方向为食品检测与生物技术。

E-mail: qiangying78@163.com



杨国武, 教授级高工, 主要研究方向为食品生物化学。

E-mail: yangguowu@smq.com.cn