

宋凯凯, 卢伟东, 徐丽丽, 等. ERIC-PCR 指纹图谱及电镜技术在纳豆生产菌鉴定中的应用[J]. 江苏农业科学, 2014, 42(10): 300-302.

ERIC-PCR 指纹图谱及电镜技术在纳豆生产菌鉴定中的应用

宋凯凯, 卢伟东, 徐丽丽, 郭立忠

(青岛农业大学山东省应用真菌重点实验室, 山东青岛 266109)

摘要: 纳豆是一种传统的日本食品, 由纳豆菌在一定温度湿度条件下发酵大豆而来, 新鲜纳豆表面金黄色, 风味独特营养丰富。纳豆的主要发酵菌为纳豆菌, 属芽孢杆菌属, 称为纳豆枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis* var. *natto*), 是好氧的革兰氏阳性菌。利用扫描电子显微镜和 ERIC-PCR 指纹图谱技术对 4 株纳豆菌 (高桥纳豆、MIZKAM 1、寿纳豆、MIZKAM 无臭) 进行了亲缘关系鉴定。结果显示, MIZKAM 无臭与寿纳豆的亲缘关系较近, 而高桥纳豆与其他品种亲缘关系较远。

关键词: 纳豆菌; 形态学; ERIC-PCR; 聚类分析; 电镜

中图分类号: Q934; Q933 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)10-0300-03

纳豆 (*natto*) 是日本传统大豆发酵食品。纳豆的主要发酵菌为纳豆菌, 属芽孢杆菌属, 是好氧的革兰氏阳性菌^[1]。纳豆菌能分解蛋白质、碳水化合物、脂肪等大分子物质, 使发酵产品中富含氨基酸、有机酸、寡聚糖等多种易被人体吸收的成分, 还能分泌各种酶和维生素, 从而可促进小肠黏膜细胞的增殖, 保证小肠功能正常^[2-6]。纳豆还能有效预防和辅助治疗心脑血管疾病。纳豆防治心脑血管疾病的药用价值主要源自纳豆激酶^[7]。自 1987 年纳豆中发现强力溶栓激酶——纳豆激酶以来, 纳豆引起了全世界的广泛关注^[8]。该酶不仅有

显著的溶栓作用, 还可以激活静脉内皮细胞的纤维蛋白酶原^[9-10]。此外, 纳豆菌发酵液中含有多达 17 种氨基酸, 其中包括人体必需的 8 种氨基酸^[11], 因此纳豆具有“超级健康食品”的美誉。然而, 由于当今市场纳豆产品种类繁多, 都有各自的菌种命名, 因此本试验利用扫描电子显微镜和 ERIC-PCR (enterobacterial repetitive intergenic consensus PCR) 指纹图谱技术^[12]对 4 个纳豆菌生产种进行鉴定分析, 旨在鉴定其个体形态的差别及亲缘关系的远近。

1 材料与方法

1.1 供试菌株

4 个纳豆菌株 (高桥纳豆、MIZKAM 1、寿纳豆、MIZKAM 无臭), 由青岛农业大学农业应用真菌研究室提供。

1.2 方法

1.2.1 单菌落培养 将 4 种纳豆菌株接种到 LB 液体培养基 (成分为 10 g/L 蛋白胨、5 g/L 酵母粉、5 g/L NaCl) 中, 放

收稿日期: 2013-12-12

基金项目: 山东省科学技术厅省良种工程项目 (编号: 2011LZ006)。

作者简介: 宋凯凯 (1988—), 女, 山东潍坊人, 硕士研究生, 主要从事食药菌分子遗传育种。E-mail: skk1003@126.com。

通信作者: 郭立忠, 教授, 主要从事食药菌的品种改良。E-mail: glz119@126.com。

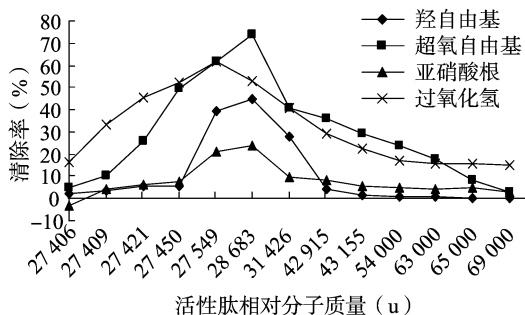


图5 不同分子量的波纹巴非哈活性肽对4种离子的清除率

明显。波纹巴非哈活性肽对超氧自由基清除率最高达 74%, 对过氧化氢清除率最高达 61.5%, 对羟自由基清除率最高达 45%, 对亚硝酸根离子的清除率最高达 24%。当波纹巴非哈活性肽分子量在 40 000 ~ 45 000 u 时, 其清除超氧自由基、过氧化氢、羟自由基和亚硝酸根的能力均达到最大。

参考文献:

- [1] 范秀萍, 吴红棉, 王娅楠, 等. 波纹巴非哈糖蛋白的分离提取及体外清除羟自由基活性的研究[J]. 食品与发酵工业, 2008, 34(1): 138-140.
- [2] 杨永芳, 杨最素, 丁国芳, 等. 菲律宾蛤仔酶解寡肽的分离及体外抗氧化作用研究[J]. 中华中医药学刊, 2011, 29(5): 1069-1072.
- [3] 郁迪, 许新建, 杨最素, 等. 菲律宾蛤仔木瓜蛋白酶水解物抗氧化活性研究[J]. 浙江海洋学院学报: 自然科学版, 2011, 30(6): 515-519.
- [4] 白林山, 王献钊, 李津晶. 靛蓝胭脂红-铜(II)体系催化光度法测定雨水中微量过氧化氢[J]. 安徽工业大学学报: 自然科学版, 2007, 24(2): 159-162.
- [5] 游丽君. 泥鳅蛋白抗氧化肽的分离纯化及抗疲劳、抗癌功效研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2010: 64-70.
- [6] 阎欲晓, 栗桂娇, 李小梅, 等. 文蛤蛋白抗氧化活性肽的研究[J]. 食品工业科技, 2007, 28(12): 121-123.

入摇床 37 ℃、180 r/min 条件下过夜培养,将过夜培养的菌液稀释 100 倍后取 50 μL 均匀涂布在 LB 固体培养基(成分为 10 g/L 蛋白胨、5 g/L 酵母粉、5 g/L NaCl、20 g/L 琼脂)上,放入 37 ℃ 恒温箱中过夜培养,分别挑取菌落做四区划线放入 37 ℃ 恒温箱中培养 5 h,挑取单菌落接种到 LB 液体培养基中过夜培养。

1.2.2 菌种的形态学分析——制作纳豆菌的电镜样品

(1)将浸泡在 75% 乙醇中的洁净盖玻片取出在酒精灯火焰上烧一下,待盖玻片冷却后将其放到平板培养的菌落上轻压一下粘取菌落;然后用 PBS(pH 值为 7.4,将 2.9 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 与 29 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 用去离子水定容到 500 mL)处理 3 次,每次 10 min;用戊二醛固定液(配制比例为戊二醛:PBS:去离子水体积比 1:8:1)固定 2 d,中间换 1 次固定液。(2)固定 2 d 后用 PBS 洗 3 次,每次 10 min。(3)分别用 30%、50%、70%、90%、100% 乙醇洗样品 1 h,使其逐步脱水,再用 100% 乙醇洗样品 30 min。(4)用乙醇:叔丁醇 = 1:1 的混合液洗样品 30 min,再用 100% 叔丁醇洗样品 2 次,每次 30 min,用叔丁醇逐渐将乙醇从样本中替换出来。(5)将样本抽真空,把盖玻片压碎,将有菌的碎片用导电胶粘附到观察台上喷涂导电材料,然后在电子显微镜下观察。

1.2.3 细菌基因组 DNA 的提取(CTAB/NaCl 法) (1)将活化好的菌株转接到 5 mL LB 液体培养基中,培养至饱和状态,取 1.5 mL 培养物 10 000 r/min 离心 3 min。(2)沉淀物加入 600 μL 的 TE 缓冲液,用吸管反复吹打使之重悬,加入少量溶菌酶,37 ℃ 温浴 30 min,加入 30 μL 10% 的 SDS 和 3 μL 20 mg/mL 的蛋白酶 K,混匀,于 37 ℃ 温浴 1 h。(3)加入 100 μL 5 mol/L 的 NaCl,充分混匀,再加入 80 μL CTAB/NaCl 溶液,混匀,于 65 ℃ 温浴 15 min。(4)加入等体积的三氯甲烷、异戊醇,混匀,12 000 r/min 离心 10 min,将上清液转到一个新管中,如果难以移出上清,先用牙签去除界面物质。(5)加入等体积的酚、三氯甲烷、异戊醇,混匀,12 000 r/min 离心 10 min,将上清液转入另一支新管中。(6)加入 1 倍体积无水乙醇,轻轻混合直到 DNA 沉淀下来,放入 -20 ℃ 冰箱沉淀 30 min,取出后 12 000 r/min 离心 10 min,将沉淀转移到 1 mL 70% 乙醇中洗涤。(7)12 000 r/min 离心 15 min,弃上清,用超净工作台稍加干燥,重溶于 50 μL 的 TE 缓冲液。(8)取 2 μL 上述提取的 DNA 进行琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.4 基因组 DNA 纯度检测 用 0.8% 琼脂糖凝胶进行电泳检测,如果 DNA 条带清晰、整齐、明亮且无拖尾,则表明 DNA 完整性好且纯度较高,可用作 PCR 反应。

1.2.5 ERIC-PCR 扩增 ERIC-PCR 扩增应用的引物 ERIC1 (5'-ggggTACCTTgCgACTAACAATATgCT-3')、ERIC2 (5'-TgCTCTAgACTCTATTCCCTACCATCATgTTC-3')均由上海生工生物工程有限公司合成。ERIC-PCR 反应体系为 50 μL ,由 25 μL Dream Taq PCR Master Mix(2 \times)、2 μL 引物 ERIC1 (20 $\mu\text{mol/L}$)、2 μL 引物 ERIC2 (20 $\mu\text{mol/L}$)、3 μL 基因组 DNA、18 μL 去离子水组成。ERIC-PCR 反应条件为 95 ℃ 预变性 5 min;94 ℃ 变性 45 s,52 ℃ 退火 1 min,65 ℃ 延伸 5 min,35 个循环;最后 65 ℃ 延伸 16 min,4 ℃ 结束扩增。

2 结果与分析

2.1 形态学分析

由图 1、图 2、图 3、图 4 的电镜照片可以看出,MIZKAM 1、寿纳豆、MIZKAM 无臭的菌体呈单杆状,而高桥纳豆的菌体呈长杆状,因此 MIZKAM 1、寿纳豆、MIZKAM 无臭 3 个菌株的亲缘关系较近,而高桥纳豆与其他 3 个菌株的亲缘关系较远。

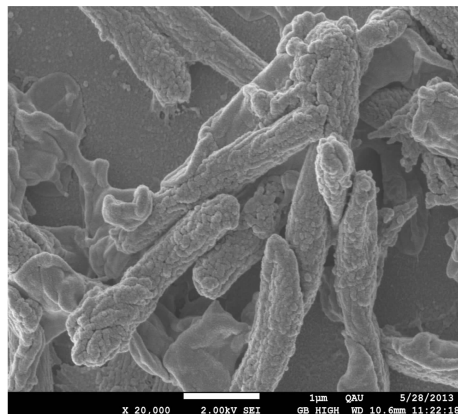


图1 高桥纳豆电镜照片

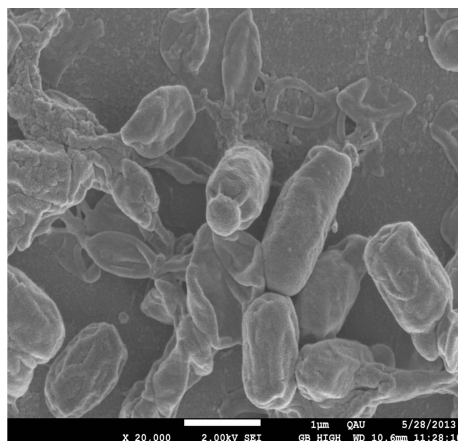


图2 MIZKAM 1电镜照片



图3 寿纳豆电镜照片

2.2 DNA 提取结果

4 个纳豆菌株的基因组 DNA 0.8% 琼脂糖凝胶电泳图谱见图 5,图中 1~4 号泳道分别为高桥纳豆、MIZKAM 1、寿纳豆、MIZKAM 无臭的 DNA 条带。从图 5 可以发现, DNA 条带

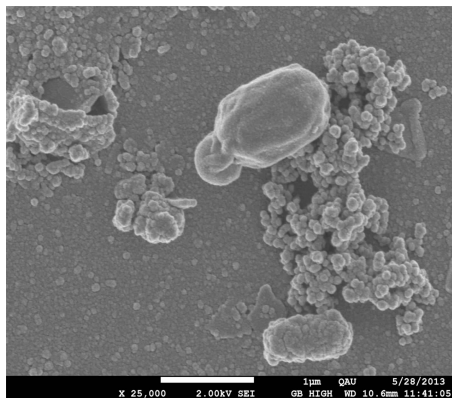


图4 MIZKAM无臭电镜照片

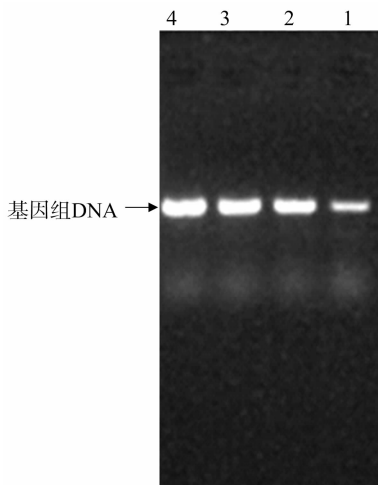


图5 4个纳豆菌株基因组DNA琼脂糖凝胶电泳图谱

清晰、整齐、明亮且无拖尾,表明 DNA 完整性好且纯度较高,可用作 PCR 反应。

2.3 基因组 DNA 的 ERIC - PCR 及聚类分析

图 6 为 4 个纳豆菌株的 ERIC - PCR 1.4% 琼脂糖凝胶电泳图谱,图中 M 泳道为 marker,1 ~ 4 号泳道分别为高桥纳豆、MIZKAM 1、寿纳豆、MIZKAM 无臭的 ERIC - PCR 电泳图谱。

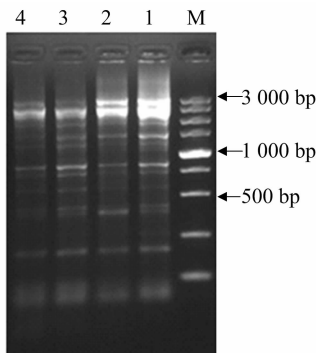


图6 4个纳豆菌株的ERIC-PCR指纹图谱

使用 NTSYS 2. 10e 软件对 4 个菌株的相似性进行聚类分析,结果见图 7。

由图 7 可知,当以相似性系数 0. 64 为阈值时,4 个菌株聚成 2 组:第 1 组为 MIZKAM 无臭、寿纳豆、MIZKAM 1, 第 2

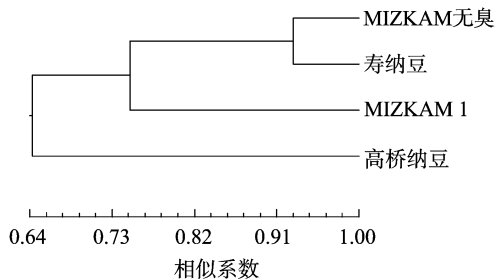


图7 NTSYS2.10e软件对ERIC-PCR图谱进行聚类分析的树状图

组为高桥纳豆;当以相似性系数 0. 75 为阈值时,4 个菌株聚成 3 组,MIZKAM 无臭和寿纳豆聚为一组,MIZKAM 1 和高桥纳豆各为一组。因此 MIZKAM 无臭与寿纳豆的亲缘关系较近。

3 讨论

本试验通过扫描电子显微镜及 ERIC - PCR 指纹图谱技术对 4 个纳豆生产菌株进行了亲缘关系鉴定。通过 ERIC - PCR 指纹图谱的聚类分析与电泳 2 种技术,最终都得到 MIZKAM 无臭与寿纳豆的亲缘关系较近,而高桥纳豆则与其他品种亲缘关系较远的结论,同时也证明了这 2 种技术对纳豆菌株鉴定的准确性与可靠性。

参考文献:

- [1] 钟青萍,余世望,梁胜媛. 纳豆菌产生抗菌物质的培养条件的优化[J]. 食品研究与开发,2001,22(4):16-18.
- [2] 陈丽花,陈有容,齐凤兰. 功能性食品——纳豆的研制[J]. 上海水产大学学报,2001,10(2):187-189.
- [3] Sumi H, Hamada H, Tsushima H, et al. A novel fibrinolytic enzyme (nattokinase) in the vegetable cheese natto: a typical and popular soybean food in the Japanese diet [J]. Experientia, 1987, 43 (10): 1110-1111.
- [4] Esaki H., Onozaki H., Osawa T. Antioxidative activity of fermented soybean products[J]. ACS Sym Ser, 1994, 546:353-360.
- [5] 钟青萍,石木标,王 斌. 多功能保健食品——纳豆[J]. 食品研究与开发,2003,24(4):81-83.
- [6] Sumi H. Antibacterial activity of bacillus natto - growth inhibition against *Escherichia coli* O157 [J]. Bioindustry, 1997, 14:47.
- [7] 奚晓琦,王加启,卜登攀,等. 纳豆芽孢杆菌的分离鉴定及纳豆激酶高产菌株的筛选 [J]. 东北农业大学学报, 2009, 40 (11): 69-75.
- [8] 蒋立文,周传云,黄香华. 纳豆菌的研究现状和应用进展[J]. 中国食物与营养, 2007(6):24-26.
- [9] Kumada K. Isolation of *Bacillus subtilis* natto which shows high fibrinolytic activity [J]. Igakutu Seibutsugaku, 1993, 126 (6): 299-303.
- [10] 平谷一,中西晃一郎,须见洋行. 血栓溶解剂:日本,日本公开特 许 89180834 [P]. 1989-05-20.
- [11] 陈有容,齐凤兰,陈丽花. 纳豆芽孢杆菌发酵液生理功能及活性成分[J]. 食品工业, 2003(4):42-44.
- [12] 张 辉,杨振泉,赵 隼,等. 大肠杆菌 ERIC - PCR 分子分型方法的建立及其初步应用 [J]. 江苏农业学报, 2010, 26 (5): 1098-1103.