

窖泥样品采集与核酸提取

Sample Collection and Nucleic Acid Extraction of Pit Mud

王雪山^{1,2,*}, 杜海², 徐岩²

¹ 山东省石榴精深加工工程技术研究中心, 山东省石榴资源综合开发工程实验室, 食品科学与制药工程学院, 枣庄学院, 枣庄, 山东; ² 工业生物技术教育部重点实验室, 酿酒科学与酶技术中心, 生物工程学院, 江南大学, 无锡, 江苏

*通讯作者邮箱: wangxueshan_1987@163.com

摘要: 中国白酒是世界六大蒸馏酒之一, 其酿造过程独特, 涉及多种微生物的相互作用及代谢。白酒酿造环境已经成为一种我国独有的特殊生态环境, 受国内外的广泛关注。浓香型白酒是中国白酒三大香型之一, 窖泥是浓香型白酒特征性风味物质-己酸乙酯代谢必不可少的环境。本方法针对窖泥特殊的厌氧环境, 采用厌氧袋完成窖泥样品的采集, 并进行窖泥宏基因组的提取及保存。本方法对研究白酒酿造微生物多样性及功能有重要价值。

关键词: 中国白酒, 窖泥, 样品采集, 宏基因组提取

材料与试剂

1. 厌氧产气袋 (MGC/三菱瓦斯化学, catalog number: C-11)
2. 自封袋 (Asone/亚速旺, catalog number: ASO-4-536-07)
3. 枪头 (碧云天 Beyotime, catalog numbers: FTIP010, FTIP200, FTIP01C)
4. 离心管 (Nest/耐思, catalog numbers: 602052, 620011, 615001)
5. Parafilm 封口膜 (Parafilm, catalog number: PM996)
6. 玻璃珠 (425~600 μ m) (Solarbio/索莱宝, catalog number: G8080-100g)
7. 10% SDS Solution (Macklin/麦克林, catalog number: D885207-250mL)
8. NaCl (国药集团化学试剂有限公司, 中国, 分析纯)
9. Tris-HCl (pH 8.0) (Macklin/麦克林, catalog number: D885212-250mL)
10. 三水合乙酸钠 (Macklin/麦克林, catalog number: S817983-500g)
11. Tris 饱和酚 (pH > 7.8) (上海源叶, catalog number: R21022-100mL)
12. 氯仿 (国药集团化学试剂有限公司, 中国, 分析纯)

13. 异戊醇 (国药集团化学试剂有限公司, 中国, 分析纯)
14. 无水乙醇 (国药集团化学试剂有限公司, 中国, 分析纯)
15. RNase A (Solarbio/索莱宝, catalog number: R8021-25)
16. DEPC 水 (上海源叶, catalog number: S30710-500mL)
17. 琼脂糖 (BIOWEST, catalog number: 111860)
18. Buffer Z 缓冲液 (见溶液配方)
19. 3 mol·L⁻¹ NaAc 溶液 (pH 5.2) (见溶液配方)

仪器设备

1. 移液枪 (Eppendorf/艾本德, catalog number: 3120000267\3120000305\3120000224)
2. 离心机 (Eppendorf/艾本德, model: 5804)
3. 制冰机 (斯科茨曼, model: AF103AS)
4. 超低温冰箱 (THERMO/赛默飞, model: ULTS1490)
5. BeadBeater 珠磨式研磨器 (Biospec, catalog number: 3110BXEUR)
6. 电泳仪 (Bio-Rad/伯乐, catalog number: 164-5050)
7. 凝胶成像仪 (MIULAB/米欧仪器, catalog number: GIS-500)
8. NanoDrop 8000 分光光度计 (THERMO/赛默飞, catalog number: YQ1633128264)
9. pH 计 (Asone/亚速旺, catalog number: C1-054-01)

实验步骤

一、窖泥样品采集

以浓香型白酒窖池为例, 分别采集窖壁、窖底三个不同空间位置的窖泥。为消除窖池不同位置窖泥的异质性, 每个位置取不同位置的三个样品为对照, 取样点示意图如图 1。为了尽量保证窖泥厌氧状态, 窖泥打孔采集后尽快放入装有厌氧产气袋的自封袋中。每个点取 20 g 样品。

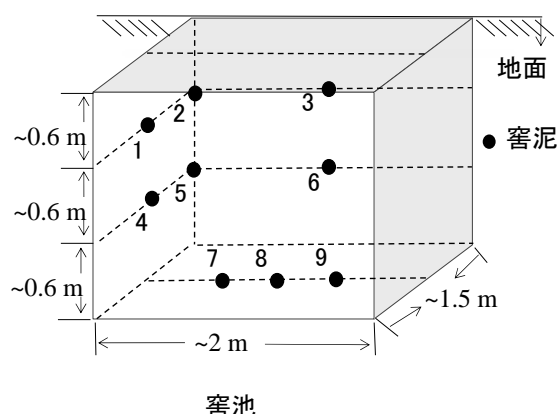


图 1. 窖池窖泥样品采集示意图

1~3 为窖壁上部窖泥，4~6 为窖壁中部窖泥，7~9 窖池底部窖泥。

二、窖泥 DNA 的提取

1. 取 1 g 窖泥样品，悬浮于 1 mL buffer Z 溶液中。
2. 混匀后，转移到加有 0.3 g 玻璃珠 (425~600 μm) 的螺帽管中，加入 150 μL 苯酚，beadbeater 细胞破碎仪以最大速度 (3,000 $\times g$) 击打 4 min (每击打 80 s，将螺帽管置于冰浴中 1 min，共击打三次)。

注：此步骤注意戴手套操作，防止苯酚伤害皮肤。此步骤后所有操作要轻柔，以防 DNA 链断裂。
3. 击打后加入 110 μL 10% SDS，轻轻颠倒混匀后，冰浴 10 min，每 5 min 轻轻颠倒摇匀。
4. 加入 150 μL 氯仿:异戊醇 (24:1) 溶液，轻轻混匀，于 10,000 $\times g$ 离心 10 min，吸取上清 (800 μL)，加入 1/10 体积的 3 mol·L⁻¹ NaAc。

注：务必不要吸取中间混浊物。
5. 用等体积的酚、酚:氯仿混合液和氯仿各抽提一次，于 10,000 $\times g$ 离心 10 min，吸取上清 (700、600、500 μL)。
6. 加入 2 倍体积的冰无水乙醇，于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 沉淀 2 h 以上，10,000 $\times g$ 离心 15 min，弃上清。
7. 沉淀于真空冷冻干燥后溶于 30 μL 无菌水中，加入 20 mg·mL⁻¹ RNase A 3 μL ，37 $^{\circ}\text{C}$ 保温 15 min；用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测提取的基因组质量及片段长度，核酸浓度测定仪 (NanoDrop 8000 分光光度计) 测定 DNA 浓度，-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存，可用

作 PCR 反应及高通量测序的模板。

溶液配方

1. Buffer Z 缓冲液

配制成终浓度为 150 mmol·L⁻¹ NaCl, 10 mmol·L⁻¹ Tris-HCl (pH 8.0) 的混合溶液, 灭菌后备用。

2. 3 mol·L⁻¹ NaAc 溶液 (pH 5.2)

称取 408.1 g NaAc·3H₂O, 溶于约 800 mL 水中, 用冰 HAc 调节 pH 值至 5.2, 加水定容至 1,000 mL。

致谢

感谢江南大学酿造微生物与应用酶学研究室的各位老师、同学对本实验方法的帮助和改进。本方法改编自博士论文 (王雪山, 2018), 已在多篇论文中应用 (Wang 等, 2017; 2018)。

参考文献

1. 王雪山. (2018). 不同环境清香类型白酒发酵微生物种群结构比较及溯源解析. 江南大学.
2. Wang, X., Du, H. and Xu, Y. (2017). [Source tracking of prokaryotic communities in fermented grain of Chinese strong-flavor liquor](#). *Int J Food Microbiol* 244: 27-35.
3. Wang, X., Du, H., Zhang, Y. and Xu, Y. (2018). [Environmental Microbiota Drives Microbial Succession and Metabolic Profiles during Chinese Liquor Fermentation](#). *Appl Environ Microbiol* 84(4): e02369-02317.