**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](mailto: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 μm) (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 *× 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。*

1. 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。
2. 加入150 μL氯仿:异戊醇 (24:1) 溶液，轻轻混匀，于10,000 *× 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。*

1. 用等体积的酚、酚:氯仿混合液和氯仿各抽提一次，于10,000 *× g*离心10 min，吸取上清 (700、600、500 μL)。
2. 加入2倍体积的冰无水乙醇，于-20 °C沉淀2 h以上，10,000 *× g*离心15 min，弃上清。
3. 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 °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 °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。

1. 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**

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.

Wang, X., Du, H. and Xu, Y. (2017). [Source tracking of prokaryotic communities in fermented grain of Chinese strong-flavor liquor.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28064120) *Int J Food Microbiol* 244: 27-35.

Wang, X., Du, H., Zhang, Y. and Xu, Y. (2018). [Environmental Microbiota Drives Microbial Succession and Metabolic Profiles during Chinese Liquor Fermentation.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29196296) *Appl Environ Microbiol* 84(4): e02369-02317.