

白酒酒醅非破坏性连续采集与核酸提取

Non-destructive Continuous Collection and Nucleic Acid extraction of *Baijiu* Fermented Grains

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: 中国白酒的酿造过程是个复杂的自然多菌种固态发酵过程, 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。本方法以浓香型白酒发酵过程为例, 采用酒醅专用取样器完成酒醅发酵过程样品的非破坏性连续采集, 以及酒醅宏基因组的提取及保存。提取得到的基因组满足宏基因组测序要求, 对研究白酒发酵过程微生物多样性及功能有重要价值。

关键词: 中国白酒, 酒醅, 样品采集, 宏基因组提取

材料与试剂

1. 枪头 (碧云天 Beyotime, catalog numbers: FTIP010, FTIP200, FTIP01C)
2. 离心管 (Nest/耐思, catalog numbers: 602052, 620011, 615001)
3. Parafilm 封口膜 (Parafilm, catalog number: PM996)
4. 玻璃珠 (425~600 μm) (Solarbio/索莱宝, catalog number: G8080-100g)
5. 10% SDS Solution (Macklin/麦克林, catalog number: D885207-250ml)
6. NaH_2PO_4 (国药集团化学试剂有限公司, 中国, 分析纯)
7. Na_2HPO_4 (国药集团化学试剂有限公司, 中国, 分析纯)
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. 0.1 mol·L⁻¹ PBS 缓冲液 (见溶液配方)
19. Buffer Z 缓冲液 (见溶液配方)
20. 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)

实验步骤

一、酒醅样品非破坏性连续采集

1. 以浓香型白酒窖池为例, 分别采集面糟、粮糟、底糟、双轮底糟四个不同空间位置的糟醅。为消除窖池不同位置酒醅的异质性, 每个位置取对角线位置的三个样品为对照, 取样点示意图如图 1。

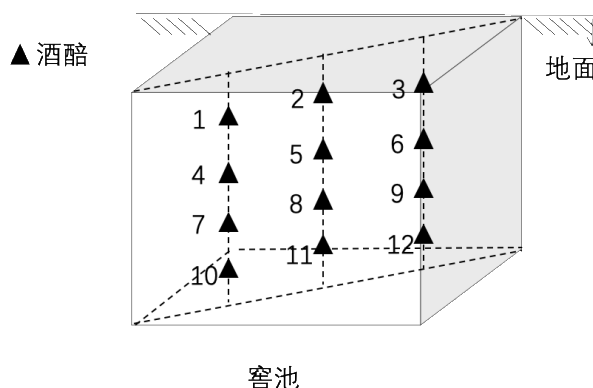


图 1. 窖池酒醅样品采集示意图

1~3 为面糟，4~6 为粮糟，7~9 为底糟，10~12 为双轮底糟。

2. 为了不破坏窖池发酵状态，采用专用取样器进行酒醅样品的采集，取样后用窖泥封好取样孔。取样器参考专利 [申请(专利)号：CN202010326489.7] 进行制作，如图 2。

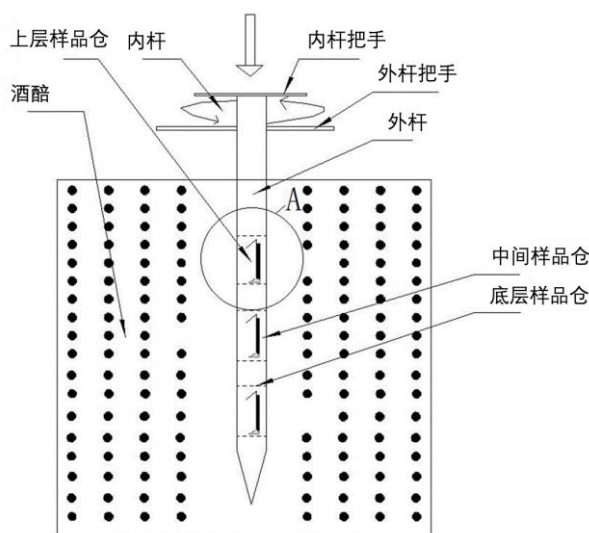


图 2. 白酒酒醅取样器

3. 以浓香型白酒发酵过程为例，发酵 0、2、4、6、8、10、15、20、25、30、40、50、60 天取样，每个点取 50 g 样品。

二、样品预处理

1. 称取 7 g 样品，用 15 ml 灭菌后的 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PBS 缓冲液悬浮，加入三颗直径 5~6 mm 玻璃珠，漩涡振荡 5 min。
2. $300 \times g$ 离心 5 min，取上清，沉淀用 PBS 缓冲液重复洗涤 3 次， $300 \times g$ 离心 5

min 后收集上清。

3. 全部上清于 $9,000 \times g$ 离心 3 min，弃去上清，收集细胞沉淀。
4. 沉淀再用 5ml PBS 洗 3 次，每次于 $9,000 \times g$ 离心 3 min 收集沉淀。
5. 沉淀重新悬浮于 2 ml PBS 溶液中， $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。

三、DNA 的提取

1. 取预处理后的样品，于 $9,000 \times g$ 离心 5 min，收集沉淀；重新悬浮于 1 ml buffer Z 溶液。
2. 混匀后，转移到加有 0.3 g 玻璃珠 ($425\sim600\text{ }\mu\text{m}$) 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 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 $3\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 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 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 沉 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 $20\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ RNase A 3 μl ， $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 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， $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存，可用作 PCR 反应及高通量测序的模板。

溶液配方

1. $0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PBS 缓冲液

分别量取 42.3 ml 1 mol·L⁻¹ NaH₂PO₄ 和 57.7 ml 1 mol·L⁻¹ Na₂HPO₄，用去离子水定容至 1,000 ml，灭菌后备用

2. 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

3. 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)，并已在多篇论文应用 (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.