

# 黄翅大白蚁肠道放线菌的分离与培养

## Isolation and cultivation of actinomycetes from the gut of *Macrotermes barneyi*

蒋宇彤<sup>1, #</sup>, 未建华<sup>1, 2, #</sup>, 李净净<sup>1</sup>, 倪金凤<sup>1, \*</sup>

<sup>1</sup>微生物技术研究院, 微生物技术国家重点实验室, 山东大学, 青岛市, 山东省

<sup>2</sup>深圳信立泰药业股份有限公司, 北京市

\*通讯作者邮箱: [jinfngni@sdu.edu.cn](mailto:jinfngni@sdu.edu.cn)

**摘要:** 黄翅大白蚁是广泛分布于中国南部地区的一种主要培菌白蚁, 为探究培菌白蚁肠道微生物的抗菌防御作用, 我们对黄翅大白蚁相关放线菌展开了研究。本方案介绍从黄翅大白蚁肠道分离培养放线菌的方法。

**Abstract:** The fungus-growing termite *Macrotermes barneyi* is a major termite widely distributed in southern China. To understand the defense of termite gut microorganisms, the Actinomyces from the gut of *M. barneyi* were studied. This protocol introduces the method of isolating and cultivating actinomycetes from the intestine of *M. barneyi*.

**关键词:** 培菌白蚁, 黄翅大白蚁, 肠道微生物, 放线菌

**研究背景:** 黄翅大白蚁作为一种培菌白蚁, 与特定真菌-鸡枞菌 (*Termitomyces*) 共生, 在白蚁巢内建立菌圃, 培养小白球菌 (*Termitosphaeria duthiei* (Berk.) Ciferri.) 为白蚁提供营养(Hager *et al.*, 2013; Ramadhar *et al.*, 2014)。培菌白蚁主要分布在非洲和亚洲热带地区, 在植物废弃物的降解过程中发挥重要作用(Aanen *et al.*, 2005)。培菌白蚁自身和菌圃真菌(鸡枞菌)易受多种真菌侵染, 但在健康的白蚁蚁巢中只有鸡枞菌生长, 白蚁或其共生菌必然存在一定的机制来抵制致病菌, 其中放线菌作为次级代谢产物主要产生者, 可能起着关键的作用(徐晓 等, 2018)。培菌昆虫相关放线菌是天然产物的广泛来源, 结构多样的次级代谢物包括多肽、大环内酯、多烯、醌酮和生物碱等, 常参与微生物-宿主的相互作用(未建华 等, 2019)。昆虫肠道、体表及巢穴作为多种微生物的栖息地, 蕴含着丰富的放线菌资源, 本文主要介绍从培菌白蚁肠道分离放线菌的方法。

## 32 材料与试剂

- 33 1. 无菌培养皿
- 34 2. 琼脂 (生工生物工程有限公司, 产品目录号: A505255)
- 35 3. 酵母粉 (Oxoid, England, 产品目录号: LP0021)
- 36 4. 胰蛋白胨 (生工生物工程有限公司, 产品目录号: A505247)
- 37 5. 麸皮琼脂培养基 (索莱宝, 北京, 产品目录号: LA8720)
- 38 6. 无机盐 ( $\text{NaCl}$ ,  $\text{KCl}$ ,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{KNO}_3$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7$
- 39  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{CaCO}_3$ ,  $\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ ,
- 40  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  皆购自国药集团化学试剂有限公司, 中国, 分析纯)
- 41 7. 引物合成, PCR 产物测序 (北京六合华大基因科技股份有限公司)
- 42 8. 16S rRNA 通用引物: 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3'); 1492R (5'-
- 43 TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3')
- 44 9. 基因组提取试剂盒 (Bacterial DNA Kit 500, Omega bio-tek 公司, D3350-01)
- 45 10. DNA 纯化试剂盒 (Gel Extraction Kit 200, Omega bio-tek 公司, D2500-02)
- 46 11. PBS 缓冲液 (见溶液配方)
- 47 12. 高氏一号培养基 (见溶液配方)
- 48 13. 可溶性淀粉培养基 (见溶液配方)
- 49 14.  $1000\times$  微量盐溶液 (见溶液配方)
- 50 15. 麸皮培养基 (见溶液配方)
- 51 16. LB 培养基 (见溶液配方)

52

## 53 仪器设备

- 54 1. 超净工作台 (品牌 AIRTCH)
- 55 2. 涂布棒
- 56 3. 分析天平 (赛多利斯公司, 北京, 型号: ALC-110.4&1100.2)
- 57 4. 高压灭菌器 (爱博公司, 山东)
- 58 5. 恒温培养箱 (精宏实验设备公司, 上海, 型号: DNP-9052)
- 59 6. 恒温水浴摇床 (知楚仪器公司, 上海)
- 60 7. PCR 仪 (品牌 TaKaRa)

8. 电泳仪（六一电泳器材厂公司，北京，型号：DYY-10C）

9. 恒温金属浴（博日科技公司，杭州）

10. 凝胶成像仪（品牌 UVItec）

11. 离心机（品牌 Eppendorf，型号：Centrifuge 5417）

12. 移液器

## 软件和数据库

1. 利用细菌 16S 序列进行菌种鉴定网站 <https://www.ezbiocloud.net/identify/>;

<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>

2. 各国菌种保藏中心网址（可参考各种培养基的配制方法，并且每种微生物都有其对

应的培养基）：1) 德国微生物菌种保藏中心（DSMZ）Leibniz Institute DSMZ-

German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, <https://www.dsmz.de/>.

2) 日本菌种保藏中心（JCM）Japan Collection of Microorganisms,

<https://jcm.brc.riken.jp/en/>. 3) 韩国菌种保藏中心（KCTC）Korean collection for

type cultures, <https://kctc.kribb.re.kr/En/Kctc>

3. MEGA7.0 软件，下载地址 MEGA7.0.26\_win64\_setup.exe,

<https://www.megasoftware.net/>

## 实验步骤

### 一、白蚁肠道放线菌的分离与纯化

1. 白蚁前、中肠样品准备参照 Wu 文章中的方法 (Wu *et al.*, 2012)，解剖后用研磨棒充分研磨样品 5-10 min，直至肠道样品呈均质状态。

2. 取各个梯度 PBS 稀释液（ $10^1$ 、 $10^2$ 、 $10^3$ 、 $10^4$ ）150  $\mu$ l 分别涂布于高氏一号培养基中，30 °C 培养，每天观察平板上菌落生长情况。

3. 根据菌落大小和形态，在平板上挑取典型的放线菌菌落（菌落干燥紧致、明显产孢）。

4. 通过稀释涂布和划线的方法，经可溶性淀粉培养基纯化至只有同一种菌落，即得到纯化的克隆。

### 二、白蚁肠道分离菌株的序列分析

1. 将纯化的菌株接入 20 ml 麸皮液体培养基中，30 °C 培养 3 d 后，离心收集菌体。

2. 利用基因组试剂盒提取菌株的基因组 DNA，用分光光度计和琼脂糖电泳法检测 DNA 浓度和纯度。
3. 利用 16S rRNA 通用引物 27F 和 1492R 扩增 16S rRNA，PCR 体系为基因组 DNA (50-200 ng/μl) 1 μl，27F 1 μl，1492R 1 μl，dNTPs 4 μl，10×Buffer 5 μl，EasyTaq 1 μl，ddH<sub>2</sub>O 37 μl。PCR 条件为预变性 95 °C 5 min；95 °C 30 s，58 °C 45 s，72 °C 2 min，35 个 PCR 循环；终延伸 72 °C 10 min。
4. 将获得的 PCR 产物进行琼脂糖（1%）凝胶电泳。
5. 切胶回收 1500 bp 片段，用 DNA 纯化试剂盒纯化 PCR 片段，纯化片段送上海生工测序。
6. 测序结果利用 NCBI Blast 比对，取相似性高的序列，利用 MAGE7.0 软件邻位法做系统发育树。

## 结果与分析

从高氏一号培养基上挑选典型的放线菌菌落，在前肠菌悬液稀释 10 倍后的平板上有比较多的具有放线菌特征的菌落。放线菌在黄翅大白蚁肠道不是优势菌，因而在较低的稀释倍数时可以得到较多的放线菌，但同一平板上细菌数目也很多，经多次稀释涂布平板和平板划线后，最后得到 13 株放线菌菌株（表 1）。其中工蚁 (Worker) 前肠 (Foregut) 来源的有 11 株，为 WF-1、WF-2、WF-3、WF-4、WF-5、WF-6、WF-7、WF-8、WF-12、WF-13、WF-14，其相似性最高的菌株分别是 *Kitasatospora cheerisanensis*, *K. cheerisanensis*, *Streptomyces puniceus*, *S. coelicoflavus*, *S. t acrolimicus*, *K. phosalacinea*, *S. pratensis*, *S. luridiscabiei*, *K. purpeofusca*, *K. purpeofusca* 和 *S. viridobrunneus*，最大相似性为 98.14%—99.93%。从工蚁中肠 (Midgut) 得到 2 株放线菌：WM-1 和 WM-3，同 *S. badius*、*S. fumigatiscleroticus* 相似性分别为 99.79%和 99.38%。

表 1. 基于 16S rRNA 的 13 株放线菌相似菌株

Table 1. The similar strains of 13 Actinomycetes based on the 16S rRNA sequences

Strains	Most similar strain in NCBI	Similarity/%
WF-1	<i>K. cheerisanensis</i> KCTC 2395(T)	99.44

WF-2	<i>K. cheerisanensis</i> KCTC 2395(T)	99.10
WF-3	<i>S. puniceus</i> NBRC 12811(T)	99.86
WF-4	<i>S. coelicoflavus</i> NBRC 15399(T)	99.72
WF-5	<i>S. tacrolimicus</i> ATCC 55098(T)	98.14
WF-6	<i>K. phosalacinea</i> NRRL B-16230(T)	99.65
WF-7	<i>S. pratensis</i> ch24(T)	99.64
WF-8	<i>S. luridiscabiei</i> NRRL B-24455(T)	99.93
WF-12	<i>K. purpeofusca</i> NRRL B-1817(T)	99.72
WF-13	<i>K. purpeofusca</i> NRRL B-1817(T)	99.86
WF-14	<i>S. viridobrunneus</i> LMG 20317(T)	99.38
WM-1	<i>S. badius</i> NRRL B-2567(T)	99.79
WM-3	<i>S. fumigatiscleroticus</i> NBRC 12999(T)	99.38

T: Type strain

从 NCBI 网站分别下载 13 株菌相似菌株的 16S rRNA 序列，利用 MAGE 7.0 软件中的 Neighbor-joining 法制作进化树，比对方法为 ClustalW。从发育树（图 1）可以看出，WF-1、WF-2、WF-6、WF-12、WF-13 属于 北里孢菌属(*Kitasatospora*)，WF-3、WF-4、WF-5、WF-7、WF-8、WF-14、WM-1 和 WM-3 属于 链霉菌属 (*Streptomyces*)，13 株菌都属于链霉菌科 *Streptomycetaceae*。菌株 WF-5 与 *S. tacrolimicus* 相似性最高，同源性为 98.14%，低于 98.65%，且系统发育树处于单独的分枝，推测菌株 WF-5 是一株新的链霉菌。

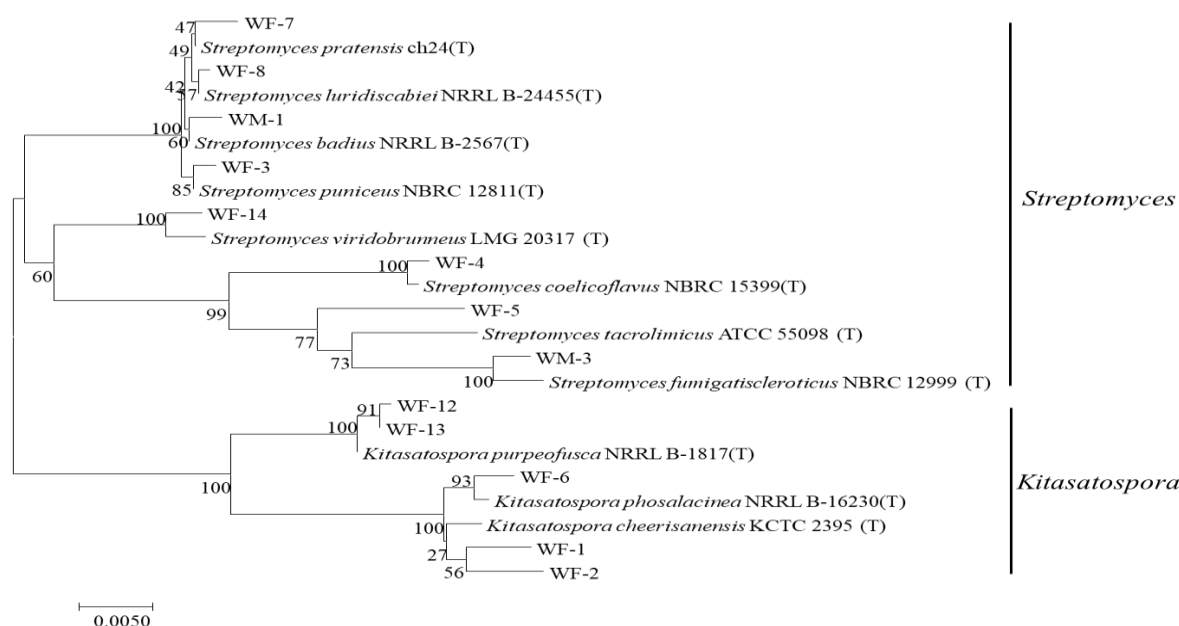


图.1 基于 16S rRNA 序列的系统发育树分析（邻位法）

Figure 1. Neighbour-joining phylogenetic tree of 13 Actinomycetes based on 16S rRNA genes

## 注意事项

1. 采集到的白蚁材料尽量在新鲜状态下立即解剖，以保证肠道放线菌的分离效果；
2. 在解剖白蚁前，清洗消毒白蚁体表，以防止体外菌的污染；
3. 解剖过程中先将白蚁头部去掉，按住白蚁用解剖针从尾部缓缓拉出肠道，可以保持肠道的完整性。

## 溶液配方

1. PBS 缓冲液：NaCl 4 g, KCl 0.1 g, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.72 g, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.12 g, 加蒸馏水 500 ml, pH 7.4。
2. 高氏一号培养基 (g/L)：可溶性淀粉 20 g, KNO<sub>3</sub> 1 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>•3H<sub>2</sub>O 0.5 g, MgSO<sub>4</sub>•7H<sub>2</sub>O 0.5 g, NaCl 0.5 g, FeSO<sub>4</sub>•7 H<sub>2</sub>O 0.01 g, 琼脂 18 g, 加蒸馏水定容至 1 L。
3. 可溶性淀粉培养基 (g/L)：可溶性淀粉 10 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1 g, MgSO<sub>4</sub> 1 g, NaCl 1 g, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 g, CaCO<sub>3</sub> 2 g, 微量盐溶液 1 ml, 加蒸馏水定容至 1 L, pH 7.2。
4. 1000×微量盐溶液 (g/L)：MnCl<sub>2</sub>•4 H<sub>2</sub>O 0.1 g, FeSO<sub>4</sub>•7 H<sub>2</sub>O 0.1 g, ZnSO<sub>4</sub>•7 H<sub>2</sub>O

0.1 g, 加蒸馏水定容至 1 L。

5. 麸皮培养基 (/L): 100 g 麸皮加入适量水, 沸水煮 30 min, 经纱布去除沉淀后, 加蒸馏水定容至 1 L。

6. LB 培养基 (g/L): NaCl 10 g, 胰蛋白胨 10 g, 酵母提取物 5 g, 琼脂 15 g, 加蒸馏水定容至 1 L, 液体培养基不加琼脂粉。

## 参考文献

1. Aanen, D. K. and Eggleton, P. (2005). Fungus-growing termites originated in African rain forest. *Curr Biol* **15**(9): 851-855.
2. Hager, F. A. and Kirchner, W. H. (2013). Vibrational long-distance communication in the termites *Macrotermes natalensis* and *Odontotermes* sp. *J Exp Biol* **216**(Pt 17): 3249-3256.
3. Ramadhar, T. R., Beemelmans, C., Currie, C. R. and Clardy, J. (2014). Bacterial symbionts in agricultural systems provide a strategic source for antibiotic discovery. *J Antibiot (Tokyo)* **67**(1): 53-58.
4. 未建华和李净净. (2019). 培菌昆虫相关放线菌的次级代谢产物研究进展. *微生物学报* **59**(10): 1864-1871.
5. 徐晓, 孙飞飞, 尹彩萍, 王滢和张应烙 (2018). 昆虫共生菌的次级代谢产物研究进展. *微生物学报* **58**(6): 1126-1140.
6. Wu, Y., Chi, S., Yun, C., Shen, Y., Tokuda, G. and Ni, J. (2012). Molecular cloning and characterization of an endogenous digestive beta-glucosidase from the midgut of the fungus-growing termite *Macrotermes barneyi*. *Insect Mol Biol* **21**(6): 604-614.

## 致谢

本项目获得国家重点基础研究发展计划 (973 计划, 号: 2011CB707402), 国家自然科学基金 (编号: 31970119, 31272370, 30870085) 及山东大学微生物技术国家重点实验室自主设置课题的支持。