

# 培菌白蚁肠道簇虫分离与分子鉴定的方法

## Isolation and Molecular Identification of Gregarine in the Gut of Fungus-growing Termite

张硕<sup>1, #</sup>, 林子佳<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

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

#共同第一作者/同等贡献

**摘要:** 簇虫是广泛分布于无脊椎动物消化道、脂肪体、马氏管和生殖器官的单细胞原生动物。簇虫不仅影响宿主的生理、繁殖和生命周期, 另外也是研究寄生虫-宿主共进化和昆虫生物防治的良好材料。本文主要介绍从培菌白蚁肠道中分离簇虫并进行分子生物学鉴定的方法。

**关键词:** 培菌白蚁, 单细胞原生动物, 簇虫, SSU rDNA

### 研究背景:

白蚁肠道中存在多种共生微生物, 包括细菌、真菌和原生动物, 根据白蚁后肠有无原生动物, 可将白蚁分为低等白蚁 (有) 和高等白蚁 (无) 两大类 (Lo *et al.*, 2011; Ni *et al.*, 2013)。培菌白蚁是一类能够在蚁巢中专一性培养真菌——鸡枞菌 (*Termitomyces*) 作为食物的高等白蚁 (Aanen *et al.*, 2009), 其肠道没有共生的原生动物, 但是在消化系统中存在寄生的簇虫。簇虫是属于顶复亚门孢子纲的一种单细胞原生动物, 主要寄生于无脊椎动物的消化道和体腔等器官中 (Rueckert *et al.*, 2019; Dias *et al.*, 2017)。簇虫是研究寄生虫-宿主协同进化和昆虫生物防治的良好材料 (Dias *et al.*, 2017; Lantova *et al.*, 2014)。同时, 簇虫被认为是顶复亚门中早期分化的生物, 其研究对了解顶复亚门的系统发育具有重要意义 (Rueckert *et al.*, 2019; Leander *et al.*, 2003)。目前为止在白蚁中发现的簇虫, 其物种的描述都是基于其形状和大小等形态学特征 (Costa-Leonardo, *et al.*, 2008), 以此方法鉴定出的簇虫种类要远远低于簇虫实际的多样性。随着分子生物学技术的发展, 核酸序列分析 (主要是 18S rDNA 序列分析) 被广泛应用于簇虫分类

鉴定中 (Dias *et al.*, 2017; Lantova *et al.*, 2014)。本文提供从培菌白蚁肠道中分离簇虫并进行分子生物学鉴定的方法，此方法也可用于从其它昆虫中分离鉴定簇虫。

## 材料与试剂

1. 乙醇 (国药集团化学试剂有限公司，上海，分析纯)
2. PBS 缓冲液 (见溶液配方)
3. SSU rDNA 通用引物：F1 (5'-GCGCTACCTGGTTGATCCTGCC-3')，R1 (5'-GATCCTTCTGCAGGTTACCTAC-3')，引物合成及 PCR 产物测序由上海生工生物工程技术有限公司完成。
4. 2X M5 Taq HiFi PCR MIX (聚合美生物科技有限公司，北京)
5. pMD19-T 载体 (TaKaRa)
6. 微量样品基因组 DNA 提取试剂盒 (TIANamp Mico DNA Kit, DP316, 天根生化科技有限公司)
7. DNA 纯化试剂盒 (Gel Extraction Kit 200, D2500-02, Omega Bio-Tek 公司)
8. 琼脂 (生工生物工程有限公司，产品目录号：A505255)
9. 酵母粉 (Oxoid, England, 产品目录号：LP0021)
10. 胰蛋白胨 (生工生物工程有限公司，上海，产品目录号：A505247)
11. 氯化钠 (生工生物工程有限公司，上海，产品目录号：A610476)
12. LB 培养基(见溶液配方)

## 仪器设备

1. 载玻片，解剖针，移液器，1.5 ml 离心管
2. 超净工作台 (品牌 AIRTCH，型号：SW-CJ-2FD)
3. 分析天平 (赛多利斯公司，北京，型号：ALC-110.4&1100.2)
4. 高压灭菌器 (申安医疗器械厂，上海，型号：LDZM-80L)
5. 恒温培养箱 (精宏实验设备公司，上海，型号：DNP-9052)
6. 恒温摇床 (知楚仪器公司，上海，型号：ZQZY-BF8)
7. PCR 仪 (品牌 TaKaRa，型号：TP600)
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, 型号: CHB-100)

10. 凝胶成像仪 (品牌 UVIttec, 型号: 97-0094-16)

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

12. 体式解剖镜 (品牌 Olympus, 型号: SZ2-ILST)

## 软件和数据库

1. 利用真核生物 18S rDNA 序列进行菌种鉴定的网站

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

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

## 实验步骤

### 一、白蚁解剖及簇虫分离

1. 本实验所涉及白蚁材料为黄翅大白蚁, 采自广东省中山市大涌镇旗山公园 (113°27'192"E, 22°48'574"N)。

2. 工蚁和兵蚁均用蒸馏水—75%酒精—蒸馏水依次清洗, 之后将白蚁放置在载玻片上, 在体式解剖镜下将整个白蚁肠道分离出来。

3. 用解剖针将白蚁肠道轻轻划破, 使其中的内容物流出, 再使用移液枪将释放出来的不同时期的簇虫收集起来, 存放于含有 PBS 缓冲液的 1.5 ml 离心管。

4. 分离得到的簇虫经 PBS 缓冲液清洗 3 次后, 一部分保存于 PBS 缓冲液中用于进行形态观察, 余下部分保存于 -20°C 用于后续的 DNA 提取。

### 二、基因组 DNA 提取和 SSU rDNA 测序

1. 取簇虫样品 50 个左右, 利用微量样品基因组 DNA 提取试剂盒提取簇虫的基因组 DNA, 用分光光度计检测 DNA 纯度, 用琼脂糖电泳法检测 DNA 浓度。

2. 利用引物 F1 和 R1 扩增 SSU rDNA 基因片段, PCR 扩增体系为: 基因组 DNA (50-200 ng/μl) 1 μl, F1 引物 1 μl, R1 引物 1 μl, 引物浓度为 10 μM, 2X M5 Taq HiFi PCR MIX 25 μl, ddH<sub>2</sub>O 22 μl。PCR 扩增条件为: 94°C 预变性 5 min; 94°C 45 s, 55°C 45 s, 72°C 2 min, 32 个循环; 72°C 延伸 10 min。

3. 将获得的 PCR 产物进行琼脂糖 (1%) 凝胶电泳。切胶回收扩增获得的片段, 用

DNA 纯化试剂盒进行纯化 (按试剂盒要求进行)。

4. 将纯化后的 SSU rDNA 基因片段与 pMD19-T 载体连接, 重组质粒送

上海生工测序。

### 三、系统发育分析

1. 测序结果在 NCBI 系统中进行 Blast 比对, 下载相似性最高的相关序列。

2. 利用 MEGA7.0 软件邻位法构建系统发育树, 确定所分离簇虫的分类地位。

### 注意事项

1. 白蚁解剖: 采集到的白蚁材料尽量在新鲜状态下立即解剖; 解剖白蚁前, 清洗消毒白蚁体表, 以防止体外杂菌的污染; 解剖过程中镊子夹住白蚁头部, 用解剖针从尾部缓缓拉出肠道, 以保持肠道的完整性。

2. 簇虫分离: 将簇虫从白蚁肠道中分离时, 需尽量避免黏附白蚁肠道的碎片, 以防止在后期进行 SSU rDNA 提取时, 获取到宿主的 SSU rDNA, 干扰簇虫的鉴定。此外, 簇虫体积较小, 在从肠道中分离时, 动作要轻柔, 以免在解剖肠道释放簇虫时破坏簇虫。

3. 形态观察: 利用普通光学显微镜观察簇虫时, 为防止盖玻片把簇虫压碎, 不盖盖玻片; 同时也要注意物镜与样品的距离, 避免物镜与样品接触。利用扫描电镜观察簇虫形态时, 脱水不可过度, 否则样品易皱缩变形。

### 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, 加入灭菌去离子水至终体积为 500 ml, 用 NaOH 或 HCl 调节 pH 至 7.4。

#### 2. LB 液体培养基

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。  
121°C, 高压蒸汽灭菌 20 min。

## 致谢

本项目获得国家自然科学基金 (编号: 31970119, 31272370) 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。应用此实验方法从培菌白蚁肠道中首次分离鉴定到簇虫 (Zhang 等, 2021)。

## 参考文献

1. Aanen, D. K., de Fine Licht, H. H., Debets, A. J., Kerstes, N. A., Hoekstra, R. F. and Boomsma, J. J. (2009). [High symbiont relatedness stabilizes mutualistic cooperation in fungus-growing termites](#). *Science* 326(5956): 1103-1106.
2. Costa-Leonardo, A. M., Casarin, F. E. & Constantini, J. P. (2008). [Record of a gregarine \(Apicomplexa: Neogregarinida\) in the abdomen of the termite \*Coptotermes gestroi\* \(Isoptera, Rhinotermitidae\)](#). *J Invertebr Pathol.* 97, 114-118.
3. Dias, G. et al. (2017). [First record of gregarines \(Apicomplexa\) in seminal vesicle of insect](#). *Sci. Rep.* (7): 175.
4. Lantova, L. & Volf, P. (2014). [Mosquito and sand fly gregarines of the genus \*Ascogregarina\* and \*Psychodiella\* \(Apicomplexa: Eugregarinorida, Aseptatorina\)—overview of their taxonomy, life cycle, host specificity and pathogenicity](#). *Infect. Genet. Evol.* (28): 616–627.
5. Leander, B. S., Clopton, R. E. & Keeling, P. J. (2003). [Phylogeny of gregarines \(Apicomplexa\) as inferred from small-subunit rDNA and beta-tubulin](#). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* (53): 345–354.
6. Lo, N., Eggleton, P. (2011). Termite phylogenetics and co-cladogenesis with symbionts. In: Bignell DE, Roisin Y, Lo N, editors. *Biology of Termites: A Modern Synthesis*. Dordrecht: Springer; 2011. p. 51–67.
7. Ni, J. and Tokuda, G. (2013). [Lignocellulose-degrading enzymes from termites and their symbiotic microbiota](#). *Biotechnol Adv.* 31(6): 838-850.
8. Rueckert, S., Betts, E. L. & Tsaoasis, A. D. (2019). [The symbiotic spectrum: Where do the gregarines fit?](#). *Trends Parasitol.* (35): 687–694.
9. Zhang S., Lin Z., Huang Q., Shen Y. and Ni J. (2021). [First record of gregarine protists \(Apicomplexa: Sporozoa\) in Asian fungus-growing termite \*Macrotermes barneyi\* \(Blattaria: Termitidae\)](#). *Sci. Rep.* 11(1):989.

