**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1, #，未建华1, 2, #，李净净1，倪金凤1, \*

1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

2深圳信立泰药业股份有限公司，北京市

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

**材料与试剂**

1. 无菌培养皿
2. 琼脂 (生工生物工程有限公司，产品目录号: A505255)
3. 酵母粉 (Oxoid, England, 产品目录号: LP0021)
4. 胰蛋白胨 (生工生物工程有限公司，产品目录号: A505247)
5. 麸皮琼脂培养基（索莱宝，北京，产品目录号: LA8720）
6. 无机盐（NaCl，KCl，Na2HPO4，NaH2PO4，KNO3，K2HPO4•3H2O，MgSO4•7 H2O，FeSO4•7 H2O，K2HPO4，MgSO4，(NH4)2SO4，CaCO3，MnCl2•4 H2O，ZnSO4•7 H2O皆购自国药集团化学试剂有限公司，中国，分析纯)
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）
8. 16SrRNA通用引物: 27F (5’-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3’); 1492R (5’-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3’）
9. 基因组提取试剂盒（Bacterial DNA Kit 500，Omega bio-tek公司，D3350-01）
10. DNA纯化试剂盒（Gel Extraction Kit 200，Omega bio-tek公司，D2500-02）
11. PBS缓冲液（见溶液配方）
12. 高氏一号培养基（见溶液配方）
13. 可溶性淀粉培养基（见溶液配方）
14. 1000×微量盐溶液（见溶液配方）
15. 麸皮培养基（见溶液配方）
16. LB 培养基（见溶液配方）

**仪器设备**

1. 超净工作台（品牌AIRTCH）
2. 涂布棒
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（爱博公司，山东）
5. 恒温培养箱（精宏实验设备公司，上海，型号：DNP-9052）
6. 恒温水浴摇床（知楚仪器公司，上海）
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](https://jcm.brc.riken.jp/en/.%203)) 韩国菌种保藏中心（KCTC）Korean collection for type cultures, <https://kctc.kribb.re.kr/En/Kctc>
3. MAGE7.0 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（101、102、103、104）150 μl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，27F1 μl，1492R 1 μl，dNTPs 4 μl，10×Buffer 5 μl, EasyTaq 1 μl，ddH2O 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. tacrolimicus*，*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 | *K. cheerisanensis* KCTC 2395(T) | 99.44 |
| WF-2 | *K. cheerisanensis* KCTC 2395(T) | 99.10 |
| WF-3 | *S. puniceus* NBRC 12811(T) | 99.86 |
| WF-4 | *S. coelicoflavus* NBRC 15399(T) | 99.72 |
| WF-5 | *S. tacrolimicus* ATCC 55098(T) | 98.14 |
| WF-6 | *K. phosalacinea* NRRL B-16230(T) | 99.65 |
| WF-7 | *S. pratensis* ch24(T) | 99.64 |
| WF-8 | *S. luridiscabiei* NRRL B-24455(T) | 99.93 |
| WF-12 | *K. purpeofusca* NRRL B-1817(T) | 99.72 |
| WF-13 | *K. purpeofusca* NRRL B-1817(T) | 99.86 |
| WF-14 | *S. viridobrunneus* LMG 20317(T) | 99.38 |
| WM-1 | *S. badius* NRRL B-2567(T) | 99.79 |
| WM-3 | *S. fumigatiscleroticus* 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。

**图片包含 形状

描述已自动生成**

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，Na2HPO4 0.72 g，NaH2PO4 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，KNO3 1 g，K2HPO4•3H2O 0.5 g，MgSO4•7H2O 0.5 g，NaCl 0.5 g，FeSO4•7 H2O 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，K2HPO4 1 g，MgSO4 1 g，NaCl 1 g，(NH4)2SO4 2 g，CaCO3 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）：MnCl2•4 H2O 0.1 g, FeSO4•7 H2O 0.1 g, ZnSO4•7 H2O 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](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15886104). *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.](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23926309) *J Exp Biol* **216**(Pt 17): 3249-3256.
3. Ramadhar, T. R., Beemelmanns, C., Currie, C. R. and Clardy, J. (2014). [Bacterial symbionts in agricultural systems provide a strategic source for antibiotic discovery.](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23921819) *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.](http://journals.im.ac.cn/html/actamicrocn/2019/10/20191003.htm) *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.](https://ie.cnki.net/kcms/detail/detail.aspx?filename=WSXB201806017&dbcode=XHDN_XNYJ&dbname=XNYTLKCJFDLAST2018&v=) *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*.](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23126269/) *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。