

粘细菌的分离鉴定及活性检测

常宁宁, 欧一新, 徐庆妍, 钱晓鸣, 郑忠辉, 黄耀坚*

(厦门大学生命科学学院, 福建 厦门 361005)

摘要: 近年来, 粘细菌由于其次级代谢产物结构新颖、生物活性多样而备受关注, 成为发展新药的重要来源. 利用已灭活酵母菌或大肠杆菌(*Escherichia coli*) 诱导法和滤纸片诱导法等方法进行粘细菌的分离, 并采取多种方法对所分离出菌株进行纯化, 从 95 份土样中共分离出 118 株粘细菌, 纯化出 54 株. 根据 16S rDNA 进行菌株鉴定, 主要的粘细菌为粘球菌属(*Myxococcus*)、珊瑚菌属(*Coralloccoccus*)、多囊菌属(*Polyangium*)和堆囊菌属(*Sorangium*). 对获得纯化的菌株进行了抗菌抗肿瘤活性测定, 结果显示有 46.3% 的菌株具有抗菌作用, 有 66.7% 的菌株具有抗肿瘤作用, 表明粘细菌是抗菌抗肿瘤活性物质的重要来源.

关键词: 粘细菌; 分离; 纯化; 分类鉴定; 活性检测

中图分类号: Q 93

文献标志码: A

文章编号: 0438-0479(2012)01-0112-05

粘细菌为革兰氏阴性细菌, 属于原核生物类群中的形态多变、可以滑动的土壤细菌, 其系统发育地位属于变形细菌的 δ 分枝. 目前, 已发现的粘细菌包含 3 个亚目, 21 个属, 大约 50 个种, 其主要生存在富有微生物和有机物的地方, 如: 腐烂的植物、草食动物的粪便、活树或死树的树皮等^[1], 并在进化的过程中形成了产生多种活性次级代谢产物的能力. 与其他革兰氏阴性细菌相比, 粘细菌具有独特的信号传递系统和形态发生过程, 还表现出复杂的社会性行为^[2]. 此外, 粘细菌作为一类较特殊的单细胞微生物类群, 在生物的发育分化研究中是很好的材料.

在过去的几十年中, 对微生物活性次级代谢产物的研究进展迅速, 并且由于越来越多的具有药理和生物活性的次级代谢产物的发现, 粘细菌也成为药源菌家族的成员^[3], 并迅速超过假单胞杆菌, 上升到第 3 位. 由于目前从放线菌等微生物中筛选新生物活性化合物的几率越来越低, 而粘细菌在这方面具有独特的优势. 就目前情况看, 溶纤维素群粘细菌在粘细菌中是主要的活性次级代谢产物生产者^[4], 对真菌和肿瘤细胞有广泛和有效的抑制作用, 从而为具有新结构或新作用机制的生物活性物质的筛选提供了一类很好的微生物资源^[5].

本文报道了对来自福建、河南、安徽、青海、云南和

重庆的土样进行粘细菌的分离、纯化及抗菌抗肿瘤活性的测定结果, 旨在为微生物生物活性物质的深入研究提供新的菌源.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 土样

取自福建、河南、安徽、青海、云南和重庆的土样共 95 份.

1.1.2 活性物质抗菌活性测定指示菌

细菌指示菌为: 枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) CMCC63501, 大肠杆菌(*Escherichia coli*) CMCC44103, 金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) CMCC26003, 短小芽孢杆菌(*Bacillus pumilus*) CMCC63202, 藤黄微球菌(*Micrococcus luteus*) CMCC28001.

真菌指示菌: 白色假丝酵母(*Candida albicans*) AS2.538 和黑曲霉(*Aspergillus niger*) ACCC30005.

以上菌株均为本实验室保存菌种.

1.1.3 抗肿瘤活性测定的肿瘤细胞株

人宫颈癌 HeLa 细胞、人肝癌 HepG2 细胞, 以上细胞株购自中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所.

1.1.4 粘细菌分离纯化、发酵及活性筛选培养基

1) CNST 培养基: KNO_3 0.5 g/L, Na_2HPO_4 0.63 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1 g/L, FeCl_3 0.01 g/L, 微量元

收稿日期: 2011-03-21

基金项目: 科技部国际合作项目(2007DFA30970); 中央高校基本业务费(2010121092)

* 通信作者: yjh@xmu.edu.cn

素混合液 1 mL(微量元素混合液: $Mn_2Cl \cdot H_2O$ 0.1 g, $CuSO_4$ 0.01 g, $ZnCl_2$ 0.02 g, $LiCl$ 0.005 g, $SnCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.005 g, H_3BO_3 0.01 g, KBr 0.02 g, KI 0.02 g, 乙二胺四乙酸(EDTA) 8 g, 无菌过滤超纯水 1 000 mL), 琼脂 15 g/L, pH 7.2.

2) 水琼脂培养基(WAX): $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 1 g/L, HEPES 0.5 g/L, 琼脂 15 g/L, pH 7.2.

3) VY/2 培养基: 安琪酵母 5 g/L, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 1 g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 g/L, VB_{12} 0.5 g/L, 琼脂 15 g/L, pH 7.2.

4) Amb 液体培养基: 可溶性淀粉 5 g/L, Tryptone 2.5 g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 g/L, K_2HPO_4 0.25 g/L, pH 6.8.

5) Rich 液体培养基: Tryptone 10 g/L, Yeast extract 1 g/L, Glucose 1 g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1 g/L, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 1 g/L, HEPES 11.9 g/L, pH 6.8.

6) PDA 培养基: 马铃薯 200 g/L(去皮, 切小块, 加水煮沸 30 min, 8 层纱布过滤, 收集滤液), Glucose 20 g/L, 琼脂 2 g/L, pH 自然.

7) DEME 培养基: RMPI-1640 或 DMEM 干粉(购自 Hyclone 公司) 10.4 g, 充分溶解于大约 800 mL 超纯水中, 加入 2.0 g Na_2CO_3 (或者 3.7 g), 搅拌均匀后, 用冰醋酸调节 pH 至 7.0~7.2, 并补水至 1 000 mL, 充分溶解后用锡纸封口, 4 °C 静置过夜, 使杂质自然沉降, 16~24 h 后加入 10%(体积分数)已灭活(56 °C 振荡 30 min)的小牛血清, 混匀后用孔径为 0.22 μm 无菌滤膜过滤除菌, 4 °C 保存.

1.2 方法

1.2.1 分离方法

1) 土样的预处理: 土样经风干研磨后加入 2 mL 的已配制好并过滤除菌的抗生素混合液(庆大霉素 40 mg/mL; 卡那霉素 10 mg/mL; 氨基青霉素 40 mg/mL), 再加入放线菌酮的 DMSO 溶液 1 mL(20 mg/mL), 55 °C 水浴 10 min, 放置过夜.

2) 土样中粘细菌子实体诱导方法: 采用灭活酵母或大肠杆菌诱导法, 适用于嗜细菌粘细菌子实体的诱导, 将灭菌(121 °C, 110 Pa, 20 min)后的糊状酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)或大肠杆菌滴加在加有放线菌酮的水琼脂培养基上(放线菌酮的终质量浓度为 25 $\mu g/mL$), 加少许土样在酵母菌或大肠杆菌滴旁边, 28 °C 培养 3 d 开始观察.

滤纸片诱导法^[6]: 适用于嗜纤维粘细菌子实体的诱导: 将预处理的腐木样品倒去残液后, 放在已铺有灭

菌滤纸的 CNST 培养基平皿上, 28~30 °C 保温培养, 7 d 后观察腐木及滤纸上子实体的形成情况.

1.2.2 纯化方法

水琼脂纯化法: 体视显微镜下用无菌注射器针头将子实体头部挑出转接于新鲜培养基, 待其长出透明菌膜后, 在无菌超净台内挖取透明菌膜外缘部分, 转接至添加有适量相应抗生素的新鲜培养基上.

水洗法: 在无菌培养皿中滴加数十滴无菌超纯水, 水滴间距约 1 cm, 用无菌注射器挑取子实体置于水滴中洗涤, 经数个水滴洗涤后转接至新鲜的纯化培养基中, 若子实体污染较严重, 则根据污染微生物种类及污染程度在无菌水及培养基中添加相应抗生素, 28 °C 培养.

水浴加热法: 挑取子实体至装有含有适量无菌抗生素混合液中, 55 °C 水浴 10 min, 后 10 000 r/min 离心 1 min, 超净台内除去上清, 转接子实体至新鲜纯化培养基上, 28 °C 培养.

转接琼脂块法^[6]: 首先在倒置显微镜下观察菌株菌膜生长情况, 圈出较为纯净的部分, 后挑取这部分琼脂块转接至添加有适量相应抗生素的新鲜培养基上, 28 °C 培养.

1.2.3 验纯

液体培养基摇瓶培养观察菌株是否已纯化, 噬细菌类粘细菌用 Rich 培养基, 噬纤维类粘细菌用 Amb 培养基, 3 d 后如果培养液镜检细胞均一, 且呈典型粘细菌长棒状细胞, 则说明该菌株已纯化, 可以继续做后续实验并保种.

1.2.4 菌株分子鉴定

粘细菌 DNA 的提取采用 NaOH-CTAB 法^[7].

16S rDNA 片段扩增: PCR 反应体系(总体积 25 μL): ddH₂O 17.75 μL , 引物 27f 1 μL , 10 \times PCR Buffer 2.5 μL , 引物 1492r 1 μL , dNTP 2 μL , 模板 DNA 0.5 μL , DMSO 1 μL , Taq 酶 0.5 μL .

PCR 反应程序: 95 °C 预变性 5 min; 95 °C 变性 45 s, 55 °C 退火 45 s, 72 °C 延伸 90 s, 30 个循环; 72 °C 10 min.

PCR 产物回收纯化测序: 采用 Cycle-pure Kit 切胶回收, 委托英骏公司进行测序, 测序引物为 27f 和 1492r.

16S rDNA 序列比对: 选择适当序列片段, 进入 BLAST 比对序列, 得到菌株相关分类信息.

1.2.5 抗菌活性测定

滤纸片法: 灭菌的培养基待温度降至 50 °C 左右

后,用无菌水将斜面上培养的指示菌洗下,培养基和适量的指示菌菌液混合均匀后倒平板备用.在灭菌的滤纸片(直径 6 mm)上加上 5 μ L 待测样品(样品质量浓度 20 mg/mL),风机吹干后贴于平板上.真菌一般培养温度为 28 $^{\circ}$ C,42~48 h,阳性对照为两性霉素 B;细菌 37 $^{\circ}$ C,阳性对照为庆大霉素,18~24 h 后测量抑菌圈直径.

1.2.6 抗肿瘤活性测定

抗肿瘤活性测试采用 MTT 法^[8],阳性对照为顺铂(100 μ g/mL).

2 结果与分析

2.1 粘细菌的分离纯化

从 95 份土样中共分离出 118 株粘细菌(噬纤维类粘细菌 79 株和噬细菌类粘细菌 39 株),其中已纯化 54 株[噬纤维类粘细菌(堆囊菌属和多囊菌属)15 株和噬细菌类粘细菌(粘球菌属和珊瑚菌属)39 株],噬纤维类粘细菌的纯化效率较低,仅有 19%,而噬细菌类粘细菌的纯化率为 100%,各个属所分离纯化出粘细菌的比例如表 1 所示.

在对土样进行分离的过程中发现,从腐殖质土壤中分离出粘细菌的可能性更大,但是土壤腐殖质丰富则物种多样性也相对丰富,其他杂菌尤其是真菌的污染较其他土样严重,对粘细菌的纯化工作带来较大的

表 1 粘细菌的分离纯化

Tab. 1 The isolation and puratation of Myxobacteria

属的分类地位	分离菌株数	纯化菌株数	纯化率/%
<i>Myxococcus</i>	33	33	100
<i>Coralloccoccus</i>	6	6	100
<i>Sorangium</i>	78	14	17.9
<i>Polyangium</i>	1	1	100

困难,因此,如果能找到事半功倍的土样处理方法以及粘细菌单细胞培养方法,则粘细菌纯化周期将会大大缩短,并且纯化效率也将有所提高.

2.2 粘细菌的分类鉴定

综合形态学特征,并根据 16S rDNA 基因序列分析结果,所分离得到的 118 株粘细菌可以分为 4 个属,分别为粘球菌属(*Myxococcus*),堆囊菌属(*Sorangium*),多囊菌属(*Polyangium*)和珊瑚菌属(*Coralloccoccus*).由于分离条件的限制,本实验并没有分离到相对稀有的粘细菌,因此分离培养方法有待进一步优化.

根据分离的菌株的 16S rDNA 序列,我们建立了 4 株粘球菌属菌株的系统进化树(图 1).

2.3 抗菌抗肿瘤活性测定

2.3.1 抗菌活性测定

以白色假丝酵母(*C. a*)、黑曲霉(*A. n*)、金黄色葡萄球菌(*S. a*)、枯草芽孢杆菌(*B. s*)、短小芽孢杆菌(*B. p*)、大肠杆菌(*E. c*)和藤黄微球菌(*M. l*)为指示菌,采

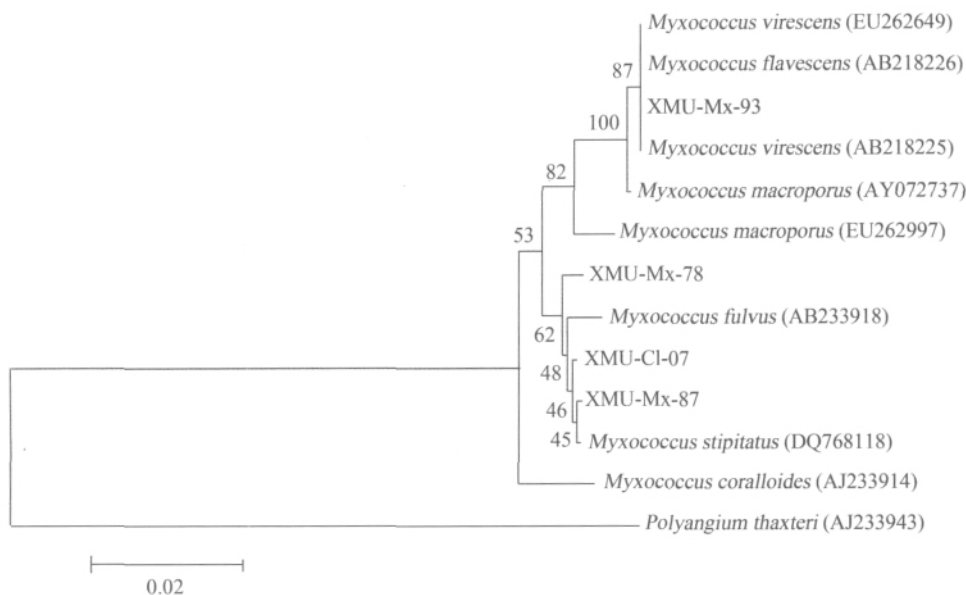


图 1 粘球菌属系统发育树

Fig. 1 Phylogenetic relationship of *Myxococcus*

用滤纸片法对分离得到的 54 株菌株的粗提物进行抗菌活性测定. 每片滤纸片含有 100 μg 粘细菌的发酵粗提物. 测定抗 C. a 和 A. n 活性时, 阳性对照采用两性霉素 B; 测定抗 S. a、B. s、B. p、E. c 活性时, 阳性对照采用庆大霉素, 阴性对照均采用甲醇. 测定结果如表 2; 在 54 株供测菌株中, 有 25 株对指示菌显示出一种或者几种的抗菌活性, 占供测菌株的 46.3%. 所分离出的 54 株粘细菌中, 粘球菌属有 33 株, 具有活性的有 13 株, 占有 39.4%; 珊瑚菌属粘细菌共 6 株, 具有活性的菌株有 4 株, 占有 66.7%; 堆囊菌属粘细菌共 14 株, 具有活性的有 7 株, 占有 50%; 仅有的多囊菌属仅表现出微弱的抗短小杆菌和芽孢杆菌的活性.

2.3.2 抗肿瘤活性

抗肿瘤活性的测定采用 MTT 法对 54 株粘细菌进行测定, 选用 HeLa 和 HepG2 两种肿瘤细胞株, 待测样品测试质量浓度分别为 50 和 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

在 54 株供测菌株中有 36 株对 HeLa 或 HepG2 有不同程度的细胞毒活性, 占供测菌株的 66.7%. 其中对 HeLa 和 HepG2 都有细胞毒活性的有 22 株. 抗肿瘤测定结果如表 3.

3 结 论

1) 对福建、河南、安徽、云南、重庆和青海的不同地域来源的 95 份腐殖质土样、沙质土样、次生林根际土样和腐烂的植物根茎进行富集培养、分离及纯化, 共分离得到了 118 株粘细菌, 并从中纯化了 54 株.

2) 通过分子鉴定, 确定了这些菌株的分类地位, 显示出粘细菌的物种多样性. 它们分属于粘球菌属、珊瑚菌属、堆囊菌属和多囊菌属, 其中粘球菌属和堆囊菌属是优势种属.

3) 以白色假丝酵母、黑曲霉、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、藤黄微球菌和大肠杆菌为指示菌, 采用滤纸片法对 54 株粘细菌发酵粗提物进行抗菌活性测定, 发现有 25 株对一种或几种指示菌显示出抗性(所分离出各属菌株均表现出较好的抗菌活性), 占供测菌株的 46.3%. 以 HeLa 细胞和 HepG2 为指示细胞株, 采用 MTT 法对上述 54 株粘细菌进行抗肿瘤活性的测试, 发现有 36 株对一种或两种细胞显示出细胞毒活性(粘球菌属表现出较好的活性), 占供测菌株的 66.7%. 上述抗性实验结果表明粘细菌是产生活性天然产物的重

表 2 粘细菌的抗菌活性

Tab. 2 The anti-microbial activities of Myxobacteria

属的分类地位(菌株数)	活性菌株数(活性菌株所占比例)	指示菌(真菌)				指示菌(细菌)		
		A. n	C. a	S. a	B. p	B. s	M. l	E. c
<i>Myxococcus</i> (33)	13(39.4%)	3	2	2	2	5	5	0
<i>Corallococcus</i> (6)	4(66.7%)	1	1	2	1	2	0	0
<i>Sorangium</i> (14)	7(50%)	2	0	1	1	2	1	0
<i>Polyangium</i> (1)	1(100%)	0	0	1	1	0	0	0
合计(54)	25(46.3%)	6	3	6	5	9	6	0

表 3 粘细菌的抗肿瘤活性

Tab. 3 The anti-tumor activity of Myxobacteria

属的分类地位	活性菌株数(活性菌株所占比例)	$\rho(\text{抗 HeLa})/(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$		$\rho(\text{抗 HepG2})/(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	
		50	100	50	100
<i>Myxococcus</i> (33)	23(69.7%)	14	17	16	19
<i>Corallococcus</i> (6)	6(100%)	3	6	4	6
<i>Sorangium</i> (14)	6(42.9%)	4	4	3	5
<i>Polyangium</i> (1)	1(100%)	1	1	1	1
合计(54)	36(66.7%)	22	28	24	31

要微生物资源.

参考文献:

- [1] Dawid W. Biology and global distribution of Myxobacteria in soils [J]. FEMS Microbiol Rev, 2000, 24(4): 403-427.
- [2] Reichenbach H, Dworkin M. The Myxobacteria[M]//The prokaryotes. 2nd ed. Albert B, New York: Spriger-Verlag, 1992: 418-3487.
- [3] Behal V. Alternative sources of biologically active substances [J]. Folia Microbiol (Praha), 2003, 48(5): 563-571.
- [4] Gerth K. Myxobacteria: proficient producers of novel natural products with various biological activities—past and future biotechnological aspects with the focus on the genus *Sorangium* [J]. J Biotechnol, 2003, 106(23): 233-253.
- [5] Reichenbach H. Myxobacteria, producers of novel bioactive substances [J]. J Ind Microbiol Biotechnol, 2001, 27(3): 149-156.
- [6] 李越中, 李健. 粘细菌的分离与纯化[J]. 微生物学通报, 1997, 24(4): 237-240.
- [7] Couch J A. Isolation of DNA from plant high polyphenolic [J]. Plant Molecular Biology Reporter, 1990, 8: 8-12.
- [8] 鄂征. 细胞培养与分子细胞学技术[M]. 北京: 北京出版社, 1995.

The Isolation, Identification and Activity Assays of the Myxobacteria

CHANG Ning-ning, OU Yi-xin, XU Qing-yan, QIAN Xiao-ming,
ZHENG Zhong-hui, HUANG Yao-jian*

(School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract: Since many different types of novel compounds with biological activities are discovered from Myxobacteria, Myxobacteria become an important resource of medicine. In this experiment, through studying 95 soil and wood samples which were collected from different regions of China, 118 Myxobacteria strains were isolated in which 54 isolates were purified. The morphological identification and 16S rDNA sequencing of 54 Myxobacteria strains showed that they are distributed in 4 genera, and most of them belong to *Myxococcus* spp. and *Sorangium* spp.. Antibiotics and anti-tumor activities of the crude extracts of these strains were also tested.

Key words: Myxobacteria; separation; purification; classification; activity detection