



生物实验室

抗菌活性放线菌的界面微滴移液互作分离筛选方法

张思琦^{1,2} 王剑³ 兰英³ 负娟莉³ 陈建^{1,2} 何湘伟^{*1,2} 杜文斌^{*3,4}

1 北京林业大学生物科学与技术学院 北京 100083

2 北京林业大学林木分子设计育种高精尖创新中心 北京 100083

3 中国科学院微生物研究所微生物资源前期开发国家重点实验室 北京 100101

4 中国科学院大学存济医学院 北京 100049

摘要:【背景】放线菌是天然产物的宝库,目前应用于临床的天然抗生素有 70%来源于放线菌的次级代谢产物。随着细菌对传统抗生素耐药问题的日趋严重,如何从自然生境中高效筛选新型活性放线菌资源并发现新型抗生素成为当前微生物学者面临的重要挑战。通过传统方法筛选活性放线菌不仅费时费力、试剂耗材消耗量大,并且筛选通量非常有限,难以对自然样品中的复杂微生物群落进行整体全面的解析。【目的】提出一种基于多孔板液滴阵列培养的新策略,可高通量筛选抗菌活性放线菌。分析模式放线菌在微液滴中的培养特征与筛选条件,为进一步建立基于液滴阵列技术的超高通量活性放线菌筛选平台奠定基础。【方法】采用界面移液技术,将传统的多孔板高通量筛选体系微缩至 1 μ L 水平,在油相填充的多孔板(96 孔板)中生成微升培养液滴阵列,每个微孔液滴中封装一个放线菌孢子或菌丝团。经过短期培养,放线菌在微滴中完成菌丝分化与次级代谢产物的分泌。这时,通过第二步界面移液技术与液滴融合加入带有荧光标记的指示菌,通过全菌拮抗筛选定位活性目标菌株,并将活性谱转化为量化的荧光数值。【结果】通过对模式放线菌的测试发现,放线菌菌丝可以在微液滴中达到最佳培养状态,并积累足够的生物质与代谢物,对荧光指示菌有明显的抑制作用。【结论】通过建立上述基于微孔板液滴阵列的高通量筛选技术,能从单细胞水平快速筛选出具有抑菌活性的菌株,显著节约了筛选成本并提高了筛选通量,为新型活性天然产物的发现提供了一种新的简单有效的筛选方法。

关键词: 微生物相互作用,金黄色葡萄球菌,放线菌,天然产物,界面微移液

Foundation items: Fundamental Research Funds for the Central Universities (2019ZY31); National Natural Science Foundation of China (31770110, 91951103, 21822408, 41977196); International Ocean Resource Survey and Exploration Project of China Ocean Mineral Resources Research and Development Association (DY135-B-02); Key Program of Frontier Sciences of the Chinese Academy of Sciences (QYZDB-SSW-SMC008)

***Corresponding authors:** E-mail: HE Xiangwei: hexiangwei@bjfu.edu.cn; DU Wenbin: wenbin@im.ac.cn

Received: 29-04-2020; **Accepted:** 04-06-2020; **Published online:** 08-07-2020

基金项目: 中央高校基本科研业务费专项资金(2019ZY31); 国家自然科学基金(31770110, 91951103, 21822408, 41977196); 中国大洋矿产资源研究开发协会国际海域资源调查与开发“十三五”项目(DY135-B-02); 中国科学院前沿科学重点研究项目(QYZDB-SSW-SMC008)

***通信作者:** E-mail: 何湘伟: hexiangwei@bjfu.edu.cn; 杜文斌: wenbin@im.ac.cn

收稿日期: 2020-04-29; **接受日期:** 2020-06-04; **网络首发日期:** 2020-07-08

Isolating and screening for antimicrobial actinobacteria in interfacial micropipetting-based droplets

ZHANG Siqu^{1,2} WANG Jian³ LAN Ying³ YUN Juanli³ CHEN Jian^{1,2}
HE Xiangwei^{*1,2} DU Wenbin^{*3,4}

1 College of Biological Science and Technology, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China

2 Beijing Advanced Innovation Center for Tree Breeding by Molecular Design, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China

3 State Key Laboratory of Microbial Resources, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

4 Savaid Medical School, University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

Abstract: [Background] Actinobacteria are a treasure trove of natural products, and 70% of the natural antibiotics currently used in clinics are derived from secondary metabolites of actinomycetes. With the increasing resistance of bacteria to traditional antibiotics, how to efficiently screen new active actinomycete resources from natural habitats and discover new antibiotics has become an important challenge for microbiologists. [Objective] However, screening active actinomycetes by traditional methods not only takes time and effort, consumes large amounts of reagent consumables, but also has a very limited screening throughput, making it difficult to analyze the complex microbial community in natural samples as a whole. This study proposes a new strategy based on micro-well plate droplet array culture, which can screen antibacterial *Actinobacteria* with high throughput. The study analyzed the culture characteristics and screening conditions of model actinomycetes in micro-droplets, which laid the foundation for the establishment of an ultra-high-throughput bioactive *Actinobacteria* screening platform based on droplet array technology. [Methods] Our new solution is to use interfacial micropipetting (IMP) technology to miniaturize the traditional multi-well high-throughput screening system to 1 μL level, and generate microliter culture droplet arrays in oil-filled micro-well plates (96-well plates), each microdroplet encapsulates an actinobacterial spore or hyphae. After a short period of cultivation, the actinobacteria complete mycelial differentiation and secretion of secondary metabolites in the microdroplets. At this time, the indicator bacteria with fluorescent markers were added through the second step of IMP and the fusion of the droplets, the active target strains were located through the antagonistic screening of the whole bacteria, and the activity spectrum was converted into quantitative fluorescence values. [Results] The model actinobacteria test was found that the mycelium can reach the optimal culture state in the microdroplets and accumulate enough biomass and metabolites, which have obvious inhibitory effects on the fluorescent indicator bacteria. [Conclusion] By establishing the above-mentioned high-throughput screening technology based on microplate droplet arrays, we can quickly screen strains with antibacterial activity from the single-cell level, which significantly saves screening costs and improves screening throughput, which provides a starting point for the discovery and study of novel functional natural products.

Keywords: microbial interaction, *Staphylococcus aureus*, actinobacteria, natural product, interfacial micropipetting

放线菌(*Actinobacteria*)是一类非常重要的微生物,广泛存在于土壤、淡水和海洋环境^[1-2]。其以特殊的菌丝形态学结构区别于其他微生物,成为微生物分类学上一个独特的分类^[3]。放线菌在营养菌丝生长的中后期产生活性次级代谢天然产物

(Secondary Metabolites),放线菌的次级代谢产物在微生物的细胞内外发挥至关重要的作用^[4]。次级代谢产物不但有利于放线菌与其他微生物进行营养和生长空间等资源的竞争,而且能够通过各种机制抑制其他微生物的生长^[5]。针对次级代谢产物的

结构和功能, 可将放线菌次级代谢产物分成毒素、抗生素、色素等^[6-9]。其中, 抗生素以其强力有效的特异性抑菌作用, 广泛地应用于人类和动物的致病微生物防治。但抗生素是一把“双刃剑”, 过量使用抗生素使致病微生物不断进化, 多重耐药“超级细菌”的产生警示我们, 筛选和开发新的替代抗生素或抑菌活性物质迫在眉睫。

传统产抗生素放线菌的筛选通常使用微生物纯培养法, 利用琼脂培养板划线分离, 获得单菌落后进行组合抑菌实验, 再对具有致病菌拮抗作用的放线菌进行大规模发酵, 分离活性物质并进行抑菌特性研究。虽然传统方法在进行分离和研究时操作简单易懂, 但其中包含的工作量和试剂使用量都十分庞大, 研究时间也需要几个月甚至几年^[10]。为了加快抗生素的发现, 迫切需要新的研究手段加快新型放线菌的分离筛选和活性天然产物的发现^[11]。

微流控技术(Microfluidics)作为一种颠覆性的微小流体的处理和操纵技术, 已经广泛应用于分子和细胞的分离分析、生物学工程以及材料科学等相关领域^[12-15]。液滴微流控(Droplet Microfluidics)作为一种微尺度的多相流体操控技术, 是微流控的重要分支。根据功能, 液滴微流控的操控单元包括微液滴的生成、融合、分割、混合、阵列捕获等^[16-23]。与连续相微流控相比, 液滴微流控的优势在于微液滴为生化反应和细胞等实验提供了一个相对封闭的微环境, 一定程度上避免了样品受到外界环境的影响、干扰或污染^[24]。在使用相对珍贵的样品或是样品量较少时, 使用液滴微流控技术进行操作和分析, 构成了多个平行的相对封闭的微反应器, 可大大减少样品使用量, 而且能利用各种操作单元进行高通量的多步操作、分析和检测。由于液滴体积小, 液滴非常适合于微生物单细胞培养, 液滴微流控可实现单细胞微生物培养、互作、观察、检测, 以及对培养后微生物的回收^[25-28]。微生物在微滴

内更快达到较高的菌浓, 可减少培养时间, 并方便对微生物的生长进行显微观察和操作, 缩短筛选时间, 提高效率。随着技术的进步, 微流控液滴技术结合不同的应用需求, 开发了多种集成液滴生成、操作、分析等一体化平台^[19,29-34]。然而, 现有的微流控芯片成本较高, 通用性还有待改进, 限制了微流控技术在微生物领域的推广和应用。

在前期微液滴筛选功能细菌的基础上^[30], 本研究提出一种简单的界面移液技术, 在普通的96孔板上, 实现放线菌1 μ L油包水微液滴培养, 通过将传统的筛选过程微型化, 以期减少试剂的消耗, 并提高实验的通量。

1 材料与方法

1.1 菌株、主要试剂和仪器

东方拟无枝菌酸菌(*Amycolatopsis orientalis*) JCM 4235 购自日本微生物菌种保藏中心(Japan Collection of Microorganisms, JCM), 该菌株在德国微生物及细胞培养物有限公司(German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, DSMZ)的编号为 DSM 40040; 吸水链霉菌(*Streptomyces hygroscopicus*) FXJ1.264 由中国科学院微生物研究所黄英研究员惠赠; 带绿色荧光蛋白(Green Fluorescent Protein, GFP)标记的金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) RN4220 由印第安纳大学医学院 Taeok Bae 教授惠赠, 为壮观霉素(Spectinomycin)抗性。

全自动荧光倒置显微镜, Nikon 公司; 精密手动八通道移液器, Eppendorf 公司; 紫外分光光度计, 上海元析仪器有限公司; 多功能酶标仪, PerkinElmer 公司。

1.2 菌株活化、培养与培养基的配制

所有菌株的活化与培养均使用葡萄糖-酵母粉-麦芽粉(Glucose-Yeast Extract-Maltose, GYM)培养基。GYM 培养基(g/L): 葡萄糖 4.0, 酵母提取物 4.0, 麦芽提取物 10.0, 琼脂 15.0 (固体培养

基中使用), 蒸馏水 1 L, 自然 pH 值, 高压蒸汽 1×10^5 Pa 灭菌 30 min 后冷却至室温使用。两株模式放线菌 *A. orientalis* JCM 4235 和 *S. hygroscopicus* FXJ1.264 的活化采用 GYM 固体琼脂板, 接种后在 28 °C 恒温培养箱中培养 7–14 d。将活化放线菌转接于 50 mL GYM 液体培养基中, 28 °C、160 r/min 摇床培养 3 d, 生成种子培养液进行后续实验。报告菌 RN4220 采用 GYM 液体培养基(壮观霉素 100 µg/mL)培养, 37 °C、160 r/min 培养 5 h 后进行后续实验。

1.3 传统抑菌圈实验

以 GFP 标记的 *S. aureus* RN4220 菌株作为抑菌活性测试的报告菌株, 首先采用传统的抑菌圈实验(Kirby-Bauer Test)测试 2 株模式放线菌 *A. orientalis* JCM 4235 和 *S. hygroscopicus* FXJ1.264 分别对报告菌株 RN4220 的抑制作用, 作为液滴筛选实验效果的对照。操作简要概括如下: 摇瓶活化 GFP 标记的 *S. aureus* RN4220 菌株, 培养至 OD_{600} 为 0.3–0.4, 12 000 r/min 离心 1 min 并用新鲜培养基重悬到 OD_{600} 为 1.0; 用无菌脱脂棉蘸取菌液, 均匀涂布在新鲜的琼脂平皿上; 同时使用无菌打孔器在模式放线菌 *A. orientalis* JCM 4235 和 *S. hygroscopicus* FXJ1.264 活化平皿上挖取包含放线菌菌苔的琼脂块, 用无菌镊子将琼脂块(有放线菌菌落的一面朝上)紧贴于均匀涂布 *S. aureus* RN4220 的琼脂平皿上, 于 37 °C 恒温箱培养 12 h 后观察抑菌圈的形成。每个平板各设 3 个平行。

抑菌试验结果判定依据产生的透明圈的直径大小, 透明圈直径大于 10 mm 为强抑制; 有透明圈但直径小于 10 mm 为弱抑制; 不存在透明圈为不抑制。

1.4 放线菌微液滴阵列培养

(1) 制备模式放线菌的孢子悬液

将活化后菌株的种子培养液(OD_{600} 为 0.8–1.0) 200 r/min 离心 5 min, 丢弃菌丝体沉淀, 将上清孢子液与新鲜 GYM 培养基 1:10 (体积分数)充分混合形成备用孢子悬液(约 5×10^7 CFU/mL), 用于下一

步的液滴生成。

(2) 分别使用 2 种微孔板进行微液滴的培养和荧光检测

实验过程中使用高温灭菌烘干后的无菌矿物油作为液滴生成和观察的油相。96 孔板每个孔内加入矿物油 150 µL 备用。利用界面注射(Interfacial Injection)原理^[30], 采用界面注射设备或八通道移液器在微孔板每个预先充满无菌矿物油的微孔中分别加入 1 µm 预制孢子悬液液滴。U 型底微孔板液滴无需离心, 自动沉降到微孔底部。平底微孔板配合 96 孔板离心机实现微液滴的融合。使用封板膜完全密封孔板, 显微镜下检查孔板内液滴, 保证每个孔内都有液滴。将孔板放入 28 °C 恒温培养箱中进行孵育, 每天进行显微观察, 记录孔板液滴内放线菌菌丝的生长情况。

(3) 模式放线菌与报告菌的互作实验

将在 37 °C、160 r/min 培养 5 h 的 *S. aureus* RN4220 (OD_{600} 为 0.3–0.4)于 12 000 r/min 离心 1 min, 并用新鲜培养基重悬到 OD_{600} 为 0.1 (约 10^7 CFU/mL)。将该菌悬液通过第 2 步界面注射, 在含放线菌预培养液滴的 96 孔板微孔中再生成一个 1 µL 的荧光指示菌液滴。荧光指示菌 *S. aureus* RN4220 液滴自动沉降到孔板底部并与放线菌液滴发生融合。

利用酶标仪与全自动倒置荧光显微镜, 分别对 *S. aureus* RN4220 菌株的生长与受抑制情况进行实时检测和观察。实验操作流程如图 1 所示。

1.5 微液滴阵列培养结果分析

放线菌的生长采用 Ti-E 显微镜明场成像观察菌丝的生长。孔板加入荧光指示菌液滴并混合后, 在 Ti-E 显微镜上采用 20 倍物镜每隔 1 h 对液滴进行荧光成像。同时设定酶标仪激发波长 488 nm、发射波长 507 nm, 对液滴内指示菌的生长进行时间序列逐孔扫描进行荧光检测。

液滴共培养后, 采用菌落 PCR 结合 16S rRNA 基因扩增子序列比对来确定微液滴共培养菌株的生长状态。利用移液器取培养后的液滴 0.3 µL 直接

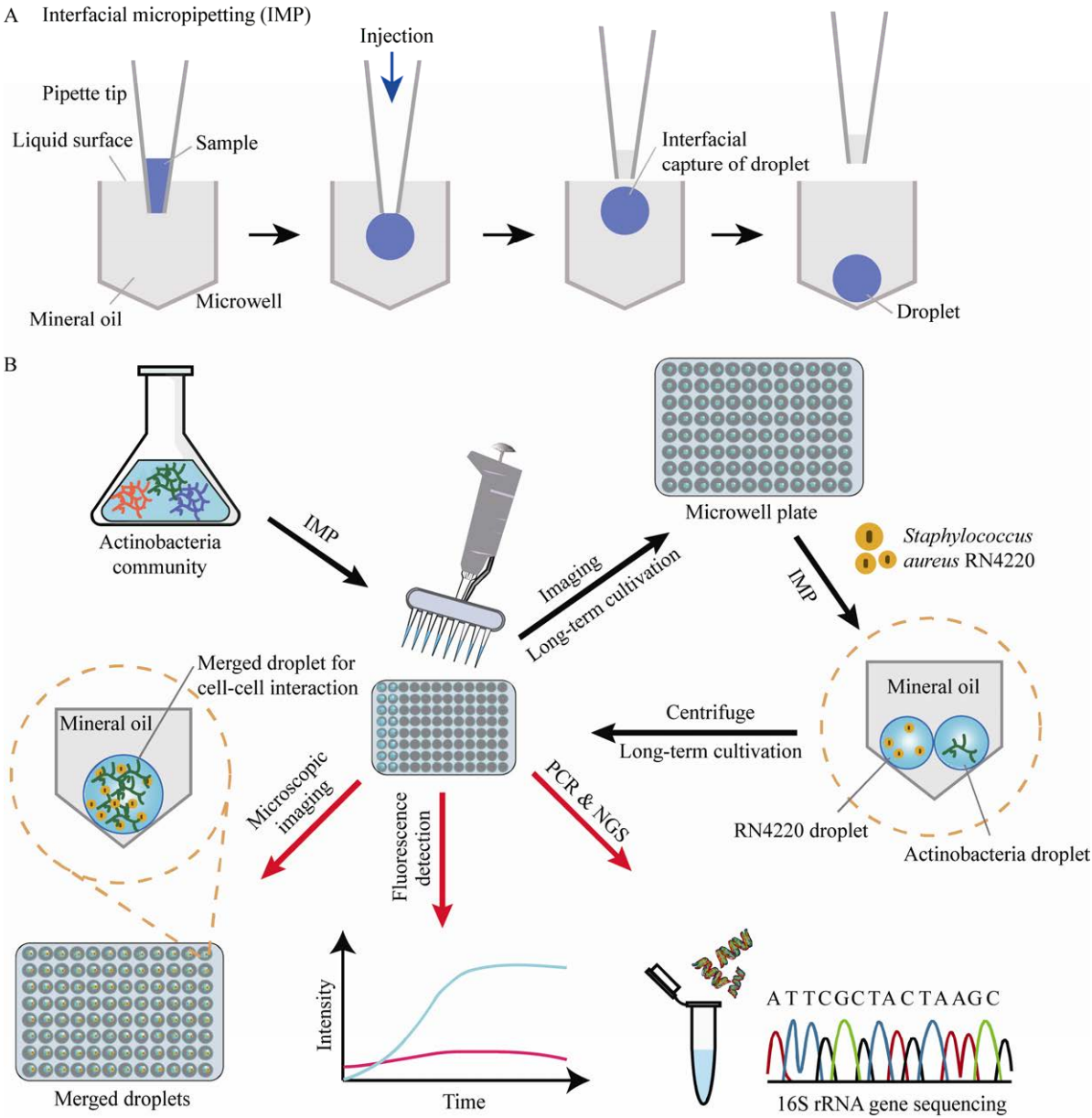


图 1 工作原理和流程示意图

Figure 1 Schematic illustration of methods and workflow

注: A: 界面微滴加液技术(IMP)示意图; B: 基于互作的抗性放线菌筛选流程

Note: A: Principle of interfacial micropipetting (IMP); B: Screening pipeline for antagonistic interaction between actinobacterial strains and GFP-labeled *S. aureus* RN4220

作为模板, 使用 16S rRNA 基因 V3-V4 区的保守引物进行 PCR 扩增, 引物序列为: 515F: 5'-GTGYC AGCMGCCGCGGTA-3'; 806R: 5'-GGACTACCA GGGTATCTAAT-3'。PCR 反应体系: 5×PCR Mix 12.5 μL, Enhancer buffer 5 μL, NP40 0.25 μL (初

始浓度为 1.07 g/mL), BSA 1.25 μL (初始浓度为 20 mg/mL), 引物 515F 0.5 μL (初始浓度为 10 μmol/mL), 引物 806R 0.5 μL (初始浓度为 10 μmol/mL), 模板 DNA 0.3 μL, ddH₂O 4.7 μL。PCR 反应条件: 95 °C 10 min; 98 °C 30 s, 52 °C

30 s, 72 °C 30 s, 35 个循环; 72 °C 2 min; 4 °C 终止。PCR 反应产物首先使用琼脂糖凝胶电泳进行分离确定扩增的有效性, 再进行 16S rRNA 基因扩增子测序。测序结果在 <https://www.ezbiocloud.net> 进行序列比对。

2 结果与分析

2.1 验证放线菌对金黄色葡萄球菌的生长抑制

通过抑菌圈实验检验 2 株放线菌对金黄色葡萄球菌 RN4220 是否具有生长抑制作用。实验选取 2 株放线菌: 东方拟无枝菌酸菌 JCM 4235 和吸水链霉菌 FXJ1.264。抑菌圈实验结果如图 2A 所示, 其中菌株 JCM 4235 透明圈直径大于 10 mm, 对 RN4220 有显著抑制作用, FXJ1.264 及空白对照组无明显透明圈产生, 显示对 RN4220 没有抑制作用。因此, 下述研究采用菌株 JCM 4235 和菌株 FXJ1.264 作为与 RN4220 拮抗互作的阳性菌株和阴性对照菌株。

2.2 用于长时间放线菌培养的多孔板微滴阵列制备和培养观察

采用界面微移液技术(Interfacial Micropipetting, IMP)实现放线菌的液滴阵列制备和生长。IMP 技术是我们此前报道的界面纳升注射技术(Interfacial Nano-injection, INJ)^[30]的简化, 借助油气相界面对水相液滴之间的剪切力, 使液滴克服八通道移液器吸头端部的表面张力进入孔板内的油相中。操作时, 将移液吸头伸入孔板内的油相液面下, 排出液滴, 再将吸头抬起移出油相, 吸头在抬离油相液面时, 油-气界面作用力克服了液滴在吸头端部的吸附力, 生成液滴并落入油相(图 1A)。IMP 方法无需将吸头靠在管壁上进行移液, 采用矿物油油相, 比重低于水溶液, 有利于液滴沉降到孔板底部中心, 并实现多液滴的融合反应。采用 U 型底部的孔板可保证 1 μ L 液滴位于孔板的中心位置, 方便采用酶标仪进行定量荧光检测, 同时可以有效避免微液滴的蒸发和污染。

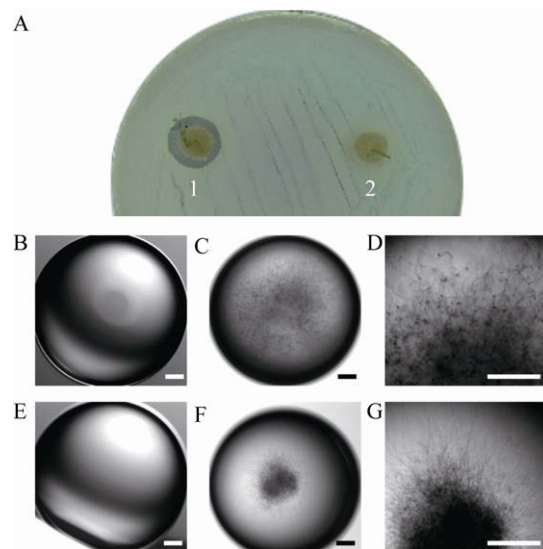


图 2 抑菌圈实验和放线菌液滴培养实验

Figure 2 Kirby-Bauer test and microscopic images of actinobacteria cultivation

注: A: 放线菌 JCM4235 (1)和 FXJ1.264 (2)对金黄色葡萄球菌 RN4220 的抑菌圈实验; B-G: 放线菌在 1 μ L 液滴中培养 0 h 和 24 h 的明场显微照片, 其中 B-D 为 FXJ1.264 菌株; E-G 为 JCM 4235 菌株。液滴最长可培养 1 个月。图 B-G 的标尺为 200 μ m

Note: A: Kirby-Bauer test to measure the inhibition of *S. aureus* RN4220 by actinobacterial strains, *A. orientalis* JCM 4235 (1) and *S. hygroscopicus* FXJ1.264 (2); B-G: Microscopic images of actinobacteria cultivated in 1 μ L droplets at 0 and 24 h, B-D: *S. hygroscopicus* FXJ1.264; E-G: *A. orientalis* JCM 4235. Scale bars for B-G are 200 μ m.

放线菌生长较慢, 在大体积液体静置培养时, 主要以基内菌丝形态进行生长, 生长通常需要 3-7 d 达到稳定期。油相覆盖的微液滴阵列也为放线菌的长时间培养观察提供了有利条件。对 1 μ L 放线菌液滴阵列培养进行了最长 1 个月的培养, 记录可能发生的液滴蒸发和污染现象。对液滴内放线菌的生长, 可通过显微镜清晰成像并观察到典型的放线菌形态学特征(图 2B-E)。随着时间的增加, 菌丝数目增加, 部分菌丝团聚, 新的菌丝团不断出现。通过观察能够得出液滴内放线菌菌丝生长的规律: 首先, 2 株模式菌的生长速度接近, 在接种 12 h 左右基内菌丝在液滴内明显生长; 24-36 h 逐渐充满整个液滴。在 36 h 之后, 放

线菌在油-水交界处生成气生菌丝并刺破界面,但气生菌丝始终被限制在液滴表面,未发现油相中有脱离的菌丝生长;培养超过 72 h 后,气生菌丝充满整个油-水界面,菌丝生长基本达到平台期;培养超过 14 d 后液滴再无明显变化。尽管如此,我们还是对液滴进行了最长 30 d 的不间断培养和连续观察,以未接菌的空液滴作为阴性对照,观察液滴培养的稳定性和可靠性,发现在整个培养过程中液滴没有明显的蒸发和污染。虽然液滴因为放线菌的代谢活动,体积有所减小(<30 % , 体积比),但液滴始终稳定存在。上述实验表明了放线菌在液滴内长时间生长培养的可行性,为将来进一步在实际样品中分离生长更为缓慢的放线菌提供了可行性。

2.3 金黄色葡萄球菌 RN4220 微液滴生长和实时荧光检测

为了验证 GFP 标记金黄色葡萄球菌(*S. aureus*) RN4220 在没有放线菌存在时能否在微液滴内正常生长,在孔板内利用界面注射生成 1 μL *S. aureus* RN4220 液滴(约 10^7 CFU/mL),并每隔 1 h 使用荧光倒置显微镜进行荧光成像检测。图 3A 是金黄色

葡萄球菌(*S. aureus*) RN4220 的荧光生长观察,对获得的荧光图像进行微液滴的荧光积分,得到 36 h 内液滴内 *S. aureus* RN4220 生长的荧光信号随时间变化的曲线,如图 3B 所示。在 5 h 后荧光强度开始增强,并保持对数期生长,25 h 左右荧光强度达到最大值。上述实验表明 *S. aureus* RN4220 在液滴内可正常生长,并可通过荧光成像进行动态监测,生长状态和常规液体培养相近。

2.4 微液滴阵列菌株互作显微观察和 16S rRNA 基因测序

为了验证微滴阵列互作培养筛选产活性代谢产物放线菌的可行性,向预培养 36 h 的 1 μL 放线菌微滴阵列的 96 孔板中加注 1 μL RN4220 液滴(10^7 CFU/mL),并利用倒置显微镜进行明场(Bright Field, BF)和针对绿色荧光蛋白(Green Fluorescent Protein, GFP)标记的 RN4220 的荧光液滴成像,分析菌株互作情况(图 4)。图 4A–4C 分别为空白液滴融合 *S. aureus* RN4220 液滴、*S. hygroscopicus* FXJ1.264 菌株和 *S. aureus* RN4220 融合液滴、*A. orientalis* JCM 4235 菌株和 *S. aureus* RN4220 融合液滴的荧光(GFP)成像。通过荧光观察和荧光强

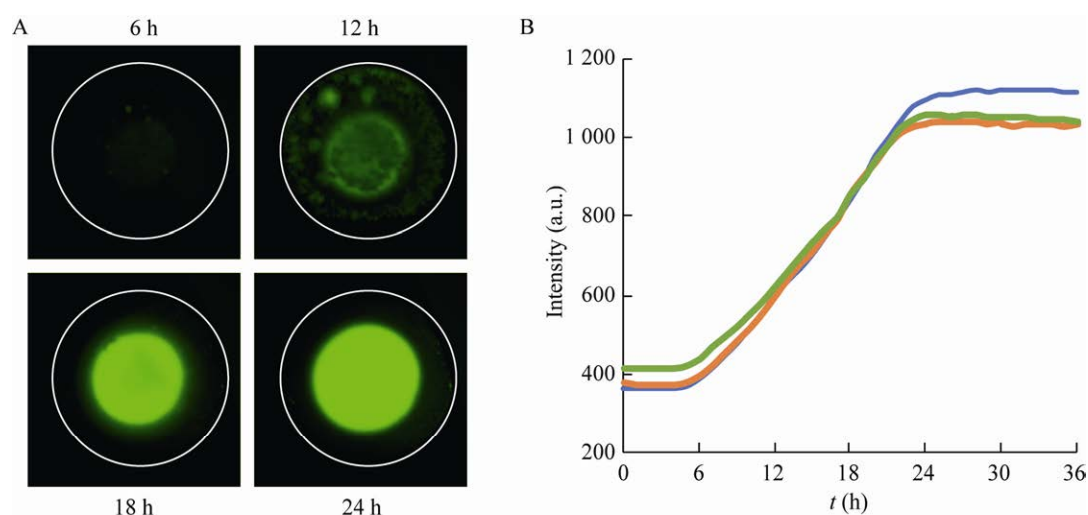


图 3 金黄色葡萄球菌 RN4220 在 1 μL 液滴中生长的荧光显微观察

Figure 3 Microscopic fluorescence imaging of the growth of *S. aureus* RN4220 in a 1 μL droplets

注: A: 1 μL 液滴在 6–24 h 的荧光显微成像照片; B: 包裹 RN4220 的 1 μL 液滴随时间变化的荧光曲线, 曲线为 3 次重复
Notes: A: Microscopic fluorescence imaging of 1 μL droplets containing *S. aureus* at 6–24 h; B: Fluorescence growth curves of *S. aureus* RN4220 obtained by a fluorescence plate reader, the curves are three replicates

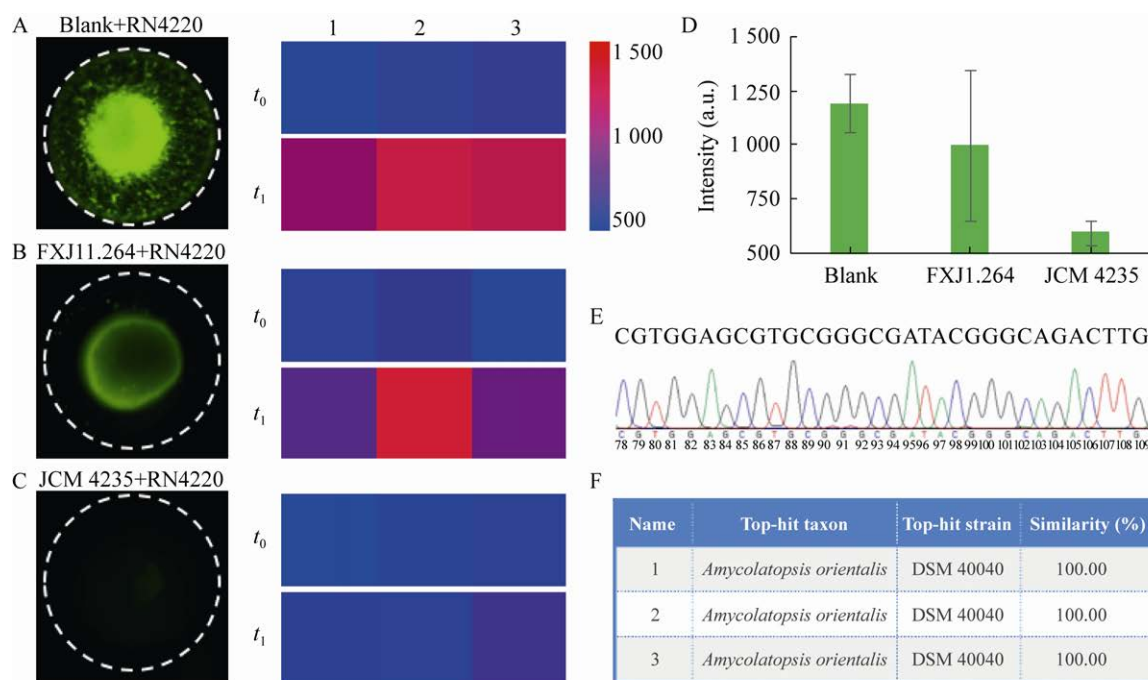


图4 液滴交互结果显微镜观察和测序结果分析

Figure 4 Microscopic observation of the antagonistic interaction in droplets and identification of the positive strains

注: A–C: 显微镜明场下 JCM 4235 菌株培养液滴融合荧光菌株液滴、FXJ1.264 菌株培养液滴融合荧光菌株液滴、荧光菌株液滴, 以及相对应的液滴在加入 RN4220 前(t_0)和加入后 24 h (t_1)酶标仪检测结果荧光强度对比; D: 为液滴荧光平均强度; E: 测序图谱分析; F: 测序比对结果

Note: A–C: Fluorescent images and intensities of droplets which RN4220 was added to blank medium, FXJ1.264, and JCM 4235, respectively, at 24 h; D: Average fluorescence intensity of the above three conditions; E: Sequencing chromatogram of a co-culture droplet of JCM 4235 and RN4220; F: Comparison of the sequences of a co-culture droplets of JCM 4235 and RN4220

度检测, 分析 *S. aureus* RN4220 液滴加入前(t_0)和加入后 24 h (t_1)酶标仪检测结果荧光强度对比, 能明显观察到 *A. orientalis* JCM 4235 液滴融合后的荧光强度没有明显增长, 荧光强度明显低于 *S. hygroscopicus* FXJ1.264 菌株和空液滴融合后的荧光强度增长。分析加入 *S. aureus* RN4220 液滴后 24 h (t_1)酶标仪检测结果, 计算平均荧光强度, 如图 4D 所示, *A. orientalis* JCM 4235 菌株在液滴融合前后的荧光强度几乎无增长, 明显低于 *S. hygroscopicus* FXJ1.264 菌株液滴融合后的荧光信号变化。上述液滴共培养实验结果与传统培养获得的菌株拮抗作用结果相符合, 表明本方法用于菌株拮抗作用筛选的可行性。

为了进一步验证实验结果, 采用分子生物学手段对共培养后 RN4220 受到放线菌抑制的液滴

(荧光强度显著低于对照组)进行了测序验证。由于液滴体积较小, 含有的菌量也较少, 如进行基因组提取, 获得的 DNA 含量过低, 达不到 PCR 扩增要求的模板浓度。因此, 采用了微液滴菌落 PCR 直接扩增测序, 用移液器从将孵育后的混合液滴中取出 0.3 μ L 作为模板, 直接加入 PCR 体系, PCR 扩增后的结果使用琼脂糖凝胶电泳验证产物。根据使用的引物对 515F/806R 对扩增后的结果进行比对, 电泳后条带明显且分布在 DNA 分子量 Marker 的 250–500 bp 的位置, 随后将 PCR 产物送去进行 16S rRNA 基因测序。图 4E 和 4F 为碱基峰值分布情况和序列比对结果。获得的碱基主峰序列明显, 序列比对结果显示, 其 16S rRNA 基因序列与加入的放线菌的相似度为 100%。这显示无需进行进一步的纯化即可对阳性液滴进行拮抗菌株

的鉴定, 有利于快速筛选未知的活性放线菌。同时由于液滴只取出了 0.3 μL 用于测序鉴定, 还有 1.7 μL 的液滴可供后续的放大培养和纯化回收, 克服了传统皮纳升液滴微流控在进行分析后无法回收极微量目标菌株的难题。

3 讨论与结论

放线菌是新型抗生素及活性天然产物发现的重要微生物资源^[2], 传统筛选方法效率低、周期长, 无法满足新型菌株细菌筛选的需求, 而微流控液滴技术^[17]的开发为微生物培养和新型微生物筛选提供了一种新的实验方法和实验思路。本实验在微流控液滴生成方法^[30]的基础上, 使用有抑菌活性的放线菌 *A. orientalis* JCM 4235、无抑菌活性的放线菌 *S. hygroscopicus* FXJ1.264 和荧光指示菌株金黄色葡萄球菌(*S. aureus*) RN4220 作为实验对象, 测试菌株在液滴内生长可行性的基础上, 使用液滴融合的方法混合放线菌和金黄色葡萄球菌进行微生物液滴内共培养, 通过显微观察、荧光强度检测、液滴 PCR 扩增、16S rRNA 基因测序等进行共培养结果的检测。

与普通液体培养相比, 放线菌在液滴培养时菌丝生长速度更快, 液滴环境有可能促进了放线菌菌丝的生长和次级代谢产物的产生。通过互作筛选到具有抑菌作用的放线菌时, 为了确保是放线菌产生的次级代谢产物影响了荧光指示菌株金黄色葡萄球菌(*S. aureus*) RN4220 的生长, 进行了液滴 PCR 扩增和 16S rRNA 基因测序, 证明了放线菌 *A. orientalis* JCM 4235 为液滴内的优势菌株, 其菌丝生长产生的次级代谢产物抑制了金黄色葡萄球菌(*S. aureus*) RN4220 的生长。上述结果证明了在微液滴中筛选抗性放线菌的可行性, 初步建立了使用微液滴筛选抗性放线菌的筛选方法。

对比国内外现有的放线菌培养技术^[31-32,35], 通常使用的是基于大体积培养的方法进行筛选。使用 96 孔板进行培养时, 也是在液体培养的基础上进行 100 μL 级别以上的放线菌培养和筛选。本实验将培养体积缩小至 1 μL , 在液滴培养的同时使

用矿物油覆盖液滴, 有效地防止了液滴水分蒸发。经过观察, 培养时间可延长至 30 d, 有利于稀有或微生物含量较少的样品培养。矿物油覆盖也减少了液滴污染的可能, 保证了实验结果的准确性。本研究基于液滴技术的放线菌互作荧光筛选实验的优势在于实验的高通量、高平行性和筛选的高效性。这一方法的未来操作可以应用于 384 孔板和 1536 孔板, 并且将微液滴筛选继续与 PCR 扩增反应、引物设计、16S rRNA 基因测序以及高通量测序等研究方法结合, 能继续提高放线菌筛选和次级代谢产物筛选的效率。

抗性放线菌筛选是微生物资源开发的重中之重, 本研究结合微液滴荧光筛选技术, 运用微生物学和多学科交叉的方法, 将传统的筛选过程微型化。建立的基于液滴的放线菌互作筛选方法, 为更加高效快速地进行未知抗性放线菌筛选工作奠定了基础, 为未来新型次级代谢产物的开发提供了新的筛选方法, 也为未来进行特定种类的微生物筛选提供了一种新的筛选思路, 可以将这一方法拓展到未知样品或稀有样品的微生物筛选中, 开发探索更多的未知微生物资源。

REFERENCES

- [1] Anderson AS, Wellington EM. The taxonomy of *Streptomyces* and related genera[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2001, 51(3): 797-814
- [2] Li WJ, Zhi XY, Tang SK. Actinobacterial systematics in China: past, present and future[J]. Microbiology China, 2013, 40(10): 1860-1873 (in Chinese)
李文均, 职晓阳, 唐蜀昆. 我国放线菌系统学研究历史、现状及未来发展趋势[J]. 微生物学通报, 2013, 40(10): 1860-1873
- [3] Nguyen TM, Kim J. *Rhodococcus pedocola* sp. nov. and *Rhodococcus humicola* sp. nov., two antibiotic-producing actinomycetes isolated from soil[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2016, 66(6): 2362-2369
- [4] Nakahira ES, Maximiano LF, Lima FR, Ussami EY. Abdominal and pelvic actinomycosis due to longstanding intrauterine device: a slow and devastating infection[J]. Autopsy and Case Reports, 2017, 7(1): 43-47
- [5] de Lima Procópio RE, da Silva IR, Martins MK, de Azevedo JL, de Araújo JM. Antibiotics produced by *Streptomyces*[J].

- The Brazilian Journal of Infectious Diseases, 2012, 16(5): 466-471
- [6] Busti E, Monciardini P, Cavaletti L, Bamonte R, Lazzarini A, Sosio M, Donadio S. Antibiotic-producing ability by representatives of a newly discovered lineage of actinomycetes[J]. Microbiology, 2006, 152(3): 675-683
- [7] Watve MG, Tickoo R, Jog MM, Bhole BD. How many antibiotics are produced by the genus *Streptomyces*?[J]. Archives of Microbiology, 2001, 176(5): 386-390
- [8] Guo CY, Wang XZ, Liu SJ, Yu JF. Screening and identification of one antagonistic actinomycetes strain[J]. Shandong Agricultural Sciences, 2018, 50(4): 43-47 (in Chinese)
郭春燕, 王旭正, 刘少杰, 于金凤. 一株拮抗放线菌菌株的筛选与鉴定[J]. 山东农业科学, 2018, 50(4): 43-47
- [9] Selvameenal L, Radhakrishnan M, Balagurunathan R. Antibiotic pigment from desert soil actinomycetes; biological activity, purification and chemical screening[J]. Indian Journal of Pharmaceutical Sciences, 2009, 71(5): 499-504
- [10] Xing L, Zhao SG, Zheng N, Li SL, Wang JQ. Advance in isolation and culture techniques of uncultured microbes: a review[J]. Microbiology China, 2017, 44(12): 3053-3066 (in Chinese)
邢磊, 赵圣国, 郑楠, 李松励, 王加启. 未培养微生物分离培养技术研究进展[J]. 微生物学通报, 2017, 44(12): 3053-3066
- [11] Liu XF, Hou Y, Ma JQ, Wang W, Zhang N, Ma YQ. Research progress in screening and application of actinomycetes[J]. Feed Research, 2020(3): 140-143 (in Chinese)
刘晓飞, 侯艳, 马京求, 王薇, 张娜, 马永强. 放线菌的筛选及应用研究进展[J]. 饲料研究, 2020(3): 140-143
- [12] Liu ZM, Yang Y, Du Y, Pang Y. Advances in droplet-based microfluidics technology and its applications[J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2017, 45(2): 282-296 (in Chinese)
刘赵森, 杨洋, 杜宇, 逢燕. 微流控液滴技术及其应用的研究进展[J]. 分析化学, 2017, 45(2): 282-296
- [13] Xiao ZL, Zhang B. Droplet microfluidics: technologies and applications[J]. Chinese Journal of Chromatography, 2011, 29(10): 949-956 (in Chinese)
肖志良, 张博. 基于液滴技术的微流控芯片实验室及其应用[J]. 色谱, 2011, 29(10): 949-956
- [14] Chen JS, Jiang JH. Droplet microfluidic technique: microdroplets formation and manipulation[J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2012, 40(8): 1293-1300 (in Chinese)
陈九生, 蒋稼欢. 微流控液滴技术: 微液滴生成与操控[J]. 分析化学, 2012, 40(8): 1293-1300
- [15] Harrison DJ, Manz A, Fan ZH, Luedi H, Widmer HM. Capillary electrophoresis and sample injection systems integrated on a planar glass chip[J]. Analytical Chemistry, 1992, 64(17): 1926-1932
- [16] Liu ZM, Yang Y, Du Y, Pang Y. Advances in droplet-based microfluidic technology and its applications[J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2017, 45(2): 282-296
- [17] Zhou JW, Khodakov DA, Ellis AV, Voelcker NH. Surface modification for PDMS-based microfluidic devices[J]. Electrophoresis, 2012, 33(1): 89-104
- [18] Dreyfus R, Tabeling P, Willaime H. Ordered and disordered patterns in two-phase flows in microchannels[J]. Physical Review Letters, 2003, 90(14): 144505
- [19] Baret JC, Miller OJ, Taly V, Ryckelynck M, El-Harrak A, Frenz L, Rick C, Samuels ML, Hutchison JB, Agresti JJ, et al. Fluorescence-activated droplet sorting (FADS): efficient microfluidic cell sorting based on enzymatic activity[J]. Lab on a Chip, 2009, 9(13): 1850-1858
- [20] Tan YC, Ho YL, Lee AP. Droplet coalescence by geometrically mediated flow in microfluidic channels[J]. Microfluidics and Nanofluidics, 2007, 3(4): 495-499
- [21] Abate AR, Weitz DA. Faster multiple emulsification with drop splitting[J]. Lab on a Chip, 2011, 11(11): 1911-1915
- [22] Liao A, Karnik R, Majumdar A, Cate JHD. Mixing crowded biological solutions in milliseconds[J]. Analytical Chemistry, 2005, 77(23): 7618-7625
- [23] Huebner A, Bratton D, Whyte G, Yang M, Demello AJ, Abell C, Hollfelder F. Static microdroplet arrays: a microfluidic device for droplet trapping, incubation and release for enzymatic and cell-based assays[J]. Lab on a Chip, 2009, 9(5): 692-698
- [24] Zhu GP, Yao JF, Wu SH, Zhang XD. Actuation of adaptive liquid microlens droplet in microfluidic devices: a review[J]. Electrophoresis, 2019, 40(8): 1148-1159
- [25] Kaminski TS, Scheler O, Garstecki P. Droplet microfluidics for microbiology: techniques, applications and challenges[J]. Lab on a Chip, 2016, 16(12): 2168-2187
- [26] Scheler O, Postek W, Garstecki P. Recent developments of microfluidics as a tool for biotechnology and microbiology[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2019, 55: 60-67
- [27] Epstein SS. The phenomenon of microbial uncultivability[J]. Current Opinion in Microbiology, 2013, 16(5): 636-642
- [28] Stewart EJ. Growing Unculturable bacteria[J]. Journal of Bacteriology, 2012, 194(16): 4151-4160
- [29] Jiang CY, Dong LB, Zhao JK, Hu XF, Shen CH, Qiao YX, Zhang XY, Wang YP, Ismagilov RF, Liu SJ, et al. High-throughput single-cell cultivation on microfluidic streak plates[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2016, 82(7): 2210-2218
- [30] Qiao YX, Zhao XY, Zhu J, Tu R, Dong LB, Wang L, Dong ZY, Wang QH, Du WB. Fluorescence-activated droplet sorting of lipolytic microorganisms using a compact optical system[J]. Lab on a Chip, 2018, 18(1): 190-196
- [31] Ma YC. High throughput screening of halophilic actinomycetes based on functional genes and heterologous expression study of potential strains[D]. Yunnan: Master's Thesis of Yunnan University, 2015 (in Chinese)
马永存. 基于多种类型功能基因高通量筛选嗜盐放线菌及潜力菌株的异源表达初探[D]. 云南: 云南大学硕士学位论文

文, 2015

- [32] Ji SQ. The establishment and applications of high-throughput cultivating and sorting method for marime microorganisms[D]. Qingdao: Doctoral Dissertation of Ocean University of China, 2011 (in Chinese)
冀世奇. 海洋微生物高通量培养和分选技术的建立及应用[D]. 青岛: 中国海洋大学博士学位论文, 2011
- [33] Xu BX, Hu BY, Wang J, Lan Y, Zhu YX, Dai X, Huang L, Huang Y, Du WB. *Virgibacillus indicus* sp. nov. and *Virgibacillus profundi* sp. nov, two moderately halophilic

bacteria isolated from marine sediment by using microfluidic streak plates[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2018, 68(6): 2015-2023

- [34] Yun JL, Zheng XW, Xu P, Zheng X, Xu JY, Cao C, Fu YS, Xu BX, Dai X, Wang Y, et al. Interfacial nanoinjection-based nanoliter single-cell analysis[J]. Small, 2020, 16(9): 1903739
- [35] Zhang JY, Liu YX, Zhang N, Hu B, Jin T, Xu HR, Qin Y, Yan PX, Zhang XN, Guo XX, et al. NRT1.1B is associated with root microbiota composition and nitrogen use in field-grown rice[J]. Nature Biotechnology, 2019, 37(6): 676-684

(上接 p.324)

征 稿 简 则

3.5 参考文献: 参考文献按文内引用的先后顺序排序编码, 未公开发表的资料请勿引用。我刊参考文献需要注明著者(文献作者不超过 10 人时全部列出, 多于 10 人时列出前 10 人, 后加“等”或“et al.”, 作者姓前名后, 名字之间用逗号隔开)、文献名、刊名、年卷期及页码。国外期刊名必须写完整, 不用缩写, 不用斜体。参考文献数量不限。

参考文献格式举例:

- [1] Mahajan-Miklos S, Tan MW, Rahme LG, Ausubel FM. Molecular mechanisms of bacterial virulence elucidated using a *Pseudomonas aeruginosa*-*Caenorhabditis elegans* pathogenesis model[J]. Cell, 1999, 96(1): 47-56
- [2] Cheng XY, Liu WW, Xu Y, Zhou NY. Screening and characterization of culturable hydrocarbon-degrading strains from the South and East China Seas[J]. Microbiology China, 2019, 46(5): 975-985 (in Chinese)
程晓宇, 刘伟伟, 许楹, 周宁一. 中国东海和南海海域可培养烃类降解细菌的筛选及功能[J]. 微生物学通报, 2019, 46(5): 975-985
- [3] Shen T, Wang JY. Biochemistry[M]. Beijing: Higher Education Press, 1990: 87 (in Chinese)
沈同, 王镜岩. 生物化学[M]. 北京: 高等教育出版社, 1990: 87
- [4] Liu X. Diversity and temporal-spatial variability of sediment bacterial communities in Jiaozhou Bay[D]. Qingdao: Doctoral Dissertation of Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, 2010 (in Chinese)
刘欣. 胶州湾沉积物细菌多样性及菌群时空分布规律[D]. 青岛: 中国科学院海洋研究所博士学位论文, 2010

4 特别说明

4.1 关于测序类论文: 凡涉及测定 DNA 或氨基酸序列的论文, 请先通过计算机网络进入国家微生物科学数据中心 NMDC (<http://nmcc.cn/>)或国际基因库 EMBL (欧洲)或 GenBank (美国)或 DDBJ (日本), 申请得到接受号(Accession No.)后再投来。

4.2 关于版权: (1) 本刊只接受作者独立创作的原创性作品, 享有自主知识产权, 无抄袭问题; 文中相关内容不曾以各种语种在国内外公开发表过, 并且不存在学术伪造、一稿多投、同一学术成果多篇发表等问题; 论文不涉及泄密及其他与著作权有关的侵权问题; 全部数据真实可靠, 且数据、图表未曾正式发表。若来稿被发现存在上述问题, 编辑部调查核实后可随时终止流程, 已发表的将发布公告公开撤销发表, 并将作者列入黑名单, 本刊不再受理该作者任何稿件。作者文责自负。(2) 凡在本刊通过审稿、同意刊出的文章, 所有形式(即各种文字、各种介质)的版权均属本刊编辑部所有。作者如有异议, 敬请事先声明。(3) 对录用的稿件编辑部有权进行文字加工, 但如涉及内容的大量改动, 将请作者过目同意。

4.3 审稿程序及提前发表: (1) 来稿刊登与否由编委会最后审定。对不录用的稿件, 一般在收稿 2 个月之内通过 E-mail 说明原因, 作者登录我刊系统或关注绑定微信也可查看。稿件经过内审、初审、终审通过后, 作者根据编辑部返回的退修意见进行修改补充后上传修改稿, 编辑部复审通过后将发出稿件录用通知单, 稿件按照投稿先后排队发表。(2) 本刊对投稿的个人和单位一视同仁。坚持文稿质量为唯一标准, 对稿件采取择优先登的原则。

5 发表费及稿费

论文一经录用, 将在发表前根据版面收取一定的发表费并酌付稿酬、赠送样刊。

6 联系方式

地址: 北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号中国科学院微生物研究所《微生物学通报》编辑部(100101)

Tel: 010-64807511; E-mail: tongbao@im.ac.cn; 网址: <http://journals.im.ac.cn/wwxtbcn>

Tel: 010-64807511; E-mail: tongbao@im.ac.cn; <http://journals.im.ac.cn/wwxtbcn>