



微生物单细胞基因组技术及其在环境微生物研究中的应用

王铤^{1,2}, 徐鹏¹, 戴欣^{1*}

¹ 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

² 河北师范大学生命科学学院, 河北 石家庄 050024

摘要: 单细胞及单细胞基因组学研究是近年生命科学研究的热点之一, 微生物单细胞基因组学研究是继微生物元基因组学(又称宏基因组学, Metagenomics)之后新发展起来的, 可有效获取环境中大量无法培养的微生物遗传信息的技术。微生物单细胞基因组技术包括单细胞获取、全基因组扩增、全基因组测序以及数据分析等步骤, 目前该技术在环境微生物研究中的应用主要集中于探索未被元基因组技术或其它常规技术探测到的新型功能基因, 或是对环境中物种丰度极小的未培养微生物的发现, 以及对微生物细胞生命进化过程的研究等。本文对微生物单细胞基因组技术中单细胞获取和全基因组扩增所涉及到的不同方法以及应用此技术对环境微生物取得的主要研究进展进行综述。

关键词: 微生物基因组, 单细胞基因组扩增技术, 多重置换扩增

近十多年来建立和发展的基于元基因组学、元转录组学等不需要分离培养的技术手段, 为各种生态系统微生物的代谢途径和生态功能分析提供了新方法。理论上, 如果测序深度足够, 元基因组获得的结果可以包含环境中每一个物种的基因组信息。然而, 由于大部分环境中的微生物群落结构复杂, 且大量微生物基因组中存在保守序列和重复序列, 以及测序本身的偏好性^[1]等原因, 难以从元基因组中直接获得微生物个体的基因组信息, 因而难以将微生物的物种信息与生理代谢、生态功能建立联系, 明确回答每一种未培

养微生物的生理生化特性、代谢途径和生态功能, 此外, 元基因组学的数据容易忽略那些丰度比较低的微生物信息^[2], 而这些微生物中可能包含该生态系统的决定者和重要的影响者。近年来, 单细胞基因组测序技术发展迅猛, 2013年被《自然-方法》评为年度技术, 认为该技术将改变生物界和医学界的许多领域。从单细胞层面获取微生物基因组信息可以直接从微生物个体基因组水平阐释其生理特性^[3]、物质和能量代谢特点^[4]及生态功能^[5], 从而弥补元组学的缺憾。但由于微生物细胞体积普遍小于哺乳动物细胞, 因此对于

基金项目: 中国大洋矿产资源研究开发协会项目(DA125-15-R-02)

*通信作者。Tel: +86-10-64807418; E-mail: daix1970@163.com

收稿日期: 2016-03-02; 修回日期: 2016-05-18; 网络出版日期: 2016-06-28

微生物细胞的单细胞全基因组扩增目前仍具有比较大的挑战。

1 微生物单细胞全基因组技术组成

微生物单细胞全基因组技术包括单细胞获取、全基因组扩增、全基因组测序以及数据分析^[3,6]等步骤。

1.1 单细胞获取

目前常用的微生物单细胞获取的方法包括有限稀释、显微操作、光镊抓取、流式细胞分选^[7]和微流控芯片等^[6,8]。对微生物单细胞的分离通常会与细胞染色技术、原位杂交技术和荧光蛋白标签等技术连用^[5,8]，以提高单细胞获取的效率。其中依赖显微镜进行的显微操作法适合细胞较大、较纯净的哺乳动物细胞样品，不适于细胞体积非常小的细菌或病毒颗粒的获取。

有限稀释法通过对菌悬液中微生物浓度进行测量，使用梯度稀释方法将单个细胞包裹在特定体积的悬液中^[8]。这种方法比较简单，单细胞出现的概率符合泊松分布(Poisson distribution)。Köster等将经过稀释的杂交瘤细胞包裹到微液滴中，结果发现：22%的微液滴包含有1个细胞，但约4%的液滴包含有2个或更多的细胞^[9]，说明有限稀释法不是十分精确，单细胞获得是随机的，需要大量重复。一般可用于对单细胞要求不是十分严格的大规模哺乳动物或微生物单细胞筛选。

光镊(Optical tweezers)技术利用了聚焦激光光束的单光束梯度力阱(Single-beam gradient force trap)与微粒之间的相互作用来抓取和控制微粒^[10]。由于光镊不仅对细胞有抓取效果，与拉曼光谱技术连用还可以对单个细胞内的各项指标进行分析^[11]。光镊使单细胞的抓取不再通过接触，减少了外界对细胞的机械损伤，可有效用于抓取具有某些特殊形状的微生物。但光镊技术获取微生物单细胞的通量较低，且较强的聚焦激光光

束(790–1064 nm)会对微生物细胞造成光损伤(Optocution)^[12–13]，目前在微生物多样性研究中应用相对较少。

流式细胞术(Flow cytometry, FCM)是目前单细胞分析中效率最高，速度最快的分选方式，其每秒钟可以对约 10^5 个细胞进行分析(Beckman coulter moflo XDP)。将流式细胞术与细胞荧光标记法连用从而对单细胞进行分选的技术被称为荧光激活细胞分选(Fluorescence activated cell sorting, FACS)^[8]。目前全球最大的单细胞实验室Bigelow laboratory for ocean sciences就是使用该技术来分选微生物单细胞。但由于流式细胞仪需要样品量大(几十至几百微升)，对样品颗粒大小有严格要求，需进行过滤处理，造成样品损失，且部分荧光染料对微生物细胞具有伤害作用，因此限制了该技术的使用范围。

微流控芯片(Microfluidic chip)可以将普通实验室中上样、反应、检测和分析等需要众多大件仪器的实验操作整合到蚀刻有微通道的微小芯片上，通过微通道控制技术使各项操作自动进行，不仅减少实验试剂的消耗，降低实验成本，而且提高实验通量，减少实验消耗的时间^[14–15]。因此微流控芯片具有高效率，低污染的特性，是目前单细胞扩增技术中常用的单细胞筛选工具和扩增反应容器^[9,16]。

微流控芯片分选单细胞的具体操作有多种，包括基于细胞大小而使用的过滤分选；基于细胞在非均匀电场下产生极化的现象而开发的介电电泳(Dielectrophoresis, DEP)分选^[17]；以及将芯片与光镊连用进行分选；或将细胞与磁粒或磁珠结合后使用磁性进行分选^[18–19]。如Adams等使用磁珠与可产生磁场强度梯度的多层流微流控芯片将3种表达不同类型蛋白质的*E. coli* MC1061菌株进行了高效回收^[18]。Moon等使用介电电泳技术将空气(Airborne)中微生物颗粒与灰尘颗粒实现了有效分离^[17]。

1.2 单细胞微生物全基因组扩增

单细胞获取以后, 需要将细胞裂解进行全基因组扩增。由于微生物单个细胞内所含有的DNA量非常少, 因此需要一些特殊的扩增方式才可以对获得的DNA进行后续分析^[20]。

目前使用较多的微生物全基因组扩增技术分为PCR扩增法及恒温扩增法2种。其中基于PCR扩增的方法有: 简并寡核苷酸引物PCR (Degenerate oligonucleotide primed PCR, DOP-PCR)技术^[7]和多次退火和成环循环扩增(Multiple annealing and looping-based amplification cycles, MALBAC)技术^[21-22]; 恒温扩增法主要为多重替代性扩增(Multiple displacement amplification, MDA)技术^[7,21-23]。

DOP-PCR技术于1992年由Telenius等提出^[24]。该技术首先使用简并的六聚体随机引物在较低的退火温度下与单链DNA结合, 预扩增出序列的一部分片段; 进而在较高的退火温度下对预扩增片段进行进一步的指数放大^[21]。该技术能够比较精确的保留细胞DNA序列拷贝数(Copy number)信息, 但由于使用PCR扩增, 一些小的错误会被成倍放大, 且会出现扩增偏好性, 导致覆盖度降低^[21,25]。此外, DOP-PCR技术使用的引物为随机引物, 需要对退火温度进行摸索, 否则会影响DNA的扩增效果^[26]。目前该技术本身较少用于单细胞扩增, 但是后来发展的部分单细胞扩增技术是在此项技术基础上改进而成的。

MDA是目前使用较广泛的单细胞扩增技术^[20], 其扩增所用的Phi 29 DNA聚合酶是一种具有连续置换特性和连续合成能力(即可进行滚环复制)的DNA聚合酶, 该酶具有3'到5'外切酶校读能力, 因此具有非常高的保真性^[27]。MDA技术可在30 °C条件下, 将随机引物与模板DNA退火并在Phi 29 DNA聚合酶作用下延伸扩增, 扩增出的DNA在与模板链脱离之前再与Phi 29 DNA聚合酶和随机引

物形成聚合体扩增, 以此类推。2002年Dean等使用该技术对0.3 ng的人类基因组DNA进行扩增, 获得的基因组DNA平均长度大于10 kb^[27]。MDA技术对其所扩增的DNA模板具有敏感性和偏好性, 目前主要通过减小反应体积或加入其它试剂的方式来减轻外源DNA污染及扩增偏好性。

Nishikawa等使用微流控技术将裂解的*E. coli*单细胞DNA分散包裹在约67 pL的液滴中进行MDA扩增, 扩增的基因组DNA覆盖率达到59%–89%, 显著降低了扩增偏好性^[20]; Pan等通过将海藻糖(Trehalose)加入MDA反应体系来避免扩增偏好性^[28]; Quake实验室将MDA扩增技术与微流控芯片技术相结合, 将扩增体积缩减到60 nL, 减轻了外源DNA污染现象^[29], 但微体积扩增后的产物均需要进行二次MDA扩增才能进行序列测定和分析。

多次退火和成环循环扩增技术MALBAC由哈佛大学谢晓亮(XS Xie)教授的研究团队首次报道^[30]。它通过拟线性的预扩增来减少非线性扩增所带来的偏好性, 对癌单细胞全基因组扩增覆盖率能够达到85%–93%。其技术流程包括: (1) 单细胞的捕获和裂解, 释放DNA; (2) 94 °C下双链DNA变性; (3) 在0 °C下MALBAC的引物(含有27个普通碱基与8个可变碱基的随机引物^[31])与模板DNA单链结合; (4) 逐渐提高温度至65 °C来使酶与模板DNA产生置换扩增反应, 产生半扩增产物; (5) 94 °C解链、58 °C成环, 最终形成的环状扩增产物称为全扩增产物; (6) 第(2)–第(4)步循环5次作为预扩增反应; (7) 使用27个普通碱基的引物进行PCR反应^[21,30]。比较发现, MALBAC和DOP-PCR之间的扩增效果差别不明显, 相较于MDA技术来说, 它们具有低偏好性的优势, 但是扩增所导致的错误率要比后者高^[32]; 此外, MDA全基因组扩增技术操作步骤比MALBAC技术简单, 减少外源污染引入的几率。

1.3 微生物单细胞全基因组测序及分析

目前单细胞基因组最常使用的测序技术为第二代Illumina测序技术,该测序技术对样品DNA的质量和数量要求相对宽泛,且具有价格低廉、通量高和错误率低的优点^[25]。

对微生物单细胞基因组测序结果的数据处理包括数据过滤^[1]、序列拼装、基因注释、基因功能注释^[33]和比较基因组分析^[34]等常规步骤,并根据具体研究目的对数据进行进一步的信息发掘。

目前微生物单细胞全基因组扩增面临的主要挑战包括定向单细胞获取技术的效率不够高,难以实现大规模定向筛选目标微生物;全基因组扩增试剂盒费用昂贵,扩增过程易于污染(对于环境微生物细胞的扩增来说,该问题尤为严重);扩增存在偏好性和错误(如扩增的不均一,等位基因缺失等),导致扩增覆盖率及准确性不理想;二代测序技术片段读长较短,对测序片段的拼接算法要求高,而第三代测序技术虽然读长长,但对测序的DNA样品质量要求较苛刻,且测序费用昂贵。

随着微流控芯片技术的引入与对微生物细胞结构研究不断完善,单细胞全基因组扩增技术将致力于小体积、高通量、低成本的发展方向。为此,我们也初步建立了与流式细胞术单细胞分选偶联的,可将单细胞基因组扩增反应控制在纳升级的液滴反应系统(中国发明专利申请号:CN20140655191.5)用于微生物单细胞基因组的研究,该系统既可保证单细胞分选的高通量,又有效减少由于分选步骤与扩增步骤分割所造成的单细胞基因组扩增污染问题,微体积的使用还极大地降低了试剂用量,节约了实验成本。

2 微生物单细胞基因组学研究进展

目前,对环境样品中微生物单细胞基因组的研究成果主要来源于2个系统:美国Bigelow研究所Ramunas Stepanauskas实验室所建立的流式细

胞分选——单细胞基因组多重置换扩增技术平台^[2]和美国斯坦福大学Quake的研究团队建立的光镊——微流控芯片——单细胞基因组多重置换扩增技术平台^[29]。与流式细胞分选平台相比,斯坦福大学的技术所用的微流控芯片可将扩增反应控制在纳升(nL)水平(流式细胞分选后的MDA扩增体系一般为10–50 μL),从而能在基因组扩增过程中较好的避免外源DNA的污染^[32]。

2009年,Woyke等使用Bigelow研究所的单细胞基因组中心的单细胞平台(Single cell genomic center, SCGC)研究了美国缅因州海湾水体样品中的微生物细胞,从中获得了2株未培养微生物以及它们的全基因组序列^[2]。经过序列比对,他们发现与培养过的同类型微生物相比,这2株未培养微生物的基因组较小,具有较少的非编码核苷酸和共生同源基因,这些缺失的基因可能影响它们在海洋特殊区域的丰度,并且导致它们难以培养。2011年,Swan等通过单细胞基因组分析,发现大洋沉积物中的未培养变形菌ARTIC96BD-19和Agg47类群皆为混合营养型(Mixotrophs)微生物,它们可通过氧化硫获取能量固定二氧化碳^[35]。

2012年,Leung等使用基于微流控芯片的单细胞全基因组扩增系统在单细胞水平上对海水水体富集物、深海沉积物以及人口腔微生物进行了全基因组扩增分析,揭示了微生物群落间独一无二的合作关系^[36]。

2013年,Rinke等使用流式细胞仪分选了9600个环境微生物单细胞进行全基因组扩增和部分细胞测序,获得了201个未培养的古菌及细菌细胞,揭示了微生物暗物质之间的生物系统学关系及其潜在代谢能力,并发现了新的嘌呤合成途径^[37]。

2015年,Davison等对蓝藻(Cyanobacteria)的多样性进行探索^[38],他们扩增生长于不同温度的原绿球藻(*Synechococcus*)单细胞全基因组序列,通过分析CRISPR序列探究自然界中大量存在的病

毒与宿主之间共同进化的原因。同年, Martijin等从美国缅因州达玛瑞斯哥塔(Damariscotta)湖中分离到1株罕见的Rickettsiaceae菌株, 通过单细胞基因组技术确定了该菌株的分类地位, 并根据其具有的趋化基因及鞭毛基因, 推测它可能具有兼性内生的特性, 为Rickettsiaceae菌株家族的起源做出了新的解释^[39]。

2014年, 我国中科院青岛能源与过程研究所徐建的研究小组率先实现在单细胞水平对微藻细胞群体合成甘油三酯过程的动态定量检测^[40], 为解析微藻通过光合作用、以二氧化碳为原料合成生物能源燃料——藻油的机制奠定了基础; 2015年, 张琦等建立了海洋甲藻(Dinoflagellates)单细胞PCR鉴定技术, 使用MDA技术扩增单细胞甲藻基因组, 通过比对其线粒体细胞色素氧化酶I (Cox 1) 基因序列, 实现对甲藻的快速准确鉴定^[41]。目前我们所在的微生物资源前期开发国家重点实验室建立了一套微生物单细胞纳升级微流控液滴反应系统, 可以实现环境样品微生物单细胞高通量分选和纳升级扩增, 目前已从深海沉积物样品中获得多个新的微生物细胞, 正在对它们进行基因组序列测定和分析。

3 结论和展望

目前, 单细胞全基因组扩增及测序已越来越多地用于研究那些未被元基因组学技术或其它常规技术探测到的新型微生物或基因, 以及用于发现环境中低丰度难以纯化培养的微生物和这些微生物细胞生命进化过程的研究。随着材料科学及高通量测序技术的不断进步, 单细胞微生物全基因组扩增技术逐渐进入微体积、高通量领域, 并且逐渐向单细胞分选、细胞裂解、全基因组扩增及高通量测序集成化方向发展。相信更精确、更快速的对微生物单细胞全基因组进行分析的新型技术将不断被开发出来。

致谢

感谢中国科学院微生物研究所杜文斌研究员、黄力研究员、王丽助理研究员以及河北师范大学生命科学院边艳青副教授对文章撰写所提出的宝贵意见及建议。

参考文献

- [1] Zhou XF, Rokas A. Prevention, diagnosis and treatment of high-throughput sequencing data pathologies. *Molecular Ecology*, 2014, 23(7): 1679–1700.
- [2] Woyke T, Xie G, Copeland A, González JM, Han C, Kiss H, Saw JH, Senin P, Yang C, Chatterji S, Cheng JF, Eisen JA, Sieracki ME, Stepanauskas R. Assembling the marine metagenome, one cell at a time. *PLoS One*, 2009, 4(4): e5299.
- [3] Lasken RS. Genomic sequencing of uncultured microorganisms from single cells. *Nature Reviews Microbiology*, 2012, 10(9): 631–640.
- [4] Tyson GW, Chapman J, Hugenholtz P, Allen EE, Ram RJ, Richardson PM, Solovyev VV, Rubin EM, Rokhsar DS, Banfield JF. Community structure and metabolism through reconstruction of microbial genomes from the environment. *Nature*, 2004, 428(6978): 37–43.
- [5] Kuypers MMM, Jørgensen BB. The future of single-cell environmental microbiology. *Environmental Microbiology*, 2007, 9(1): 6–7.
- [6] Brehm–Stecher BF, Johnson EA. Single-cell microbiology: tools, technologies, and applications. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2004, 68(3): 538–559.
- [7] 杨祎. 单细胞全基因组技术的建立和评价. 上海交通大学硕士学位论文, 2012.
- [8] Ishii S, Tago K, Senoo K. Single-cell analysis and isolation for microbiology and biotechnology: methods and applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2010, 86(5): 1281–1292.
- [9] Köster S, Angilè FE, Duan H, Agresti JJ, Wintner A, Schmitz C, Rowat AC, Merten CA, Pisignano D, Griffiths AD, Weitz DA. Drop-based microfluidic devices for encapsulation of single cells. *Lab on a Chip*, 2008, 8(7): 1110–1115.
- [10] Ashkin A, Dziedzic JM, Yamane T. Optical trapping and manipulation of single cells using infrared laser beams. *Nature*,

- 1987, 330(6150): 769–771.
- [11] Ahlwat S, Chowdhury A, Uppal A, Kumar N, Gupta PK. Use of Raman optical tweezers for cell cycle analysis. *The Analyst*, 2016, 141(4): 1339–1346.
- [12] Neuman KC, Chadd EH, Liou GF, Bergman K, Block SM. Characterization of photodamage to *Escherichia coli* in optical traps. *Biophysical Journal*, 1999, 77(5): 2856–2863.
- [13] Dholakia K, Reece P. Optical micromanipulation takes hold. *Nanotoday*, 2006, 1(1): 18–27.
- [14] Duncombe TA, Tentori AM, Herr AE. Microfluidics: reframing biological enquiry. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2015, 16(9): 554–567.
- [15] Marques MPC, Fernandes P. Microfluidic devices: useful tools for bioprocess intensification. *Molecules*, 2011, 16(10): 8368–8401.
- [16] Dhar M, Khojah R, Tay A, Di Carlo D. Research highlights: microfluidic-enabled single-cell epigenetics. *Lab on a Chip*, 2015, 15(21): 4109–4113.
- [17] Moon HS, Nam YW, Park JC, Jung HI. Dielectrophoretic separation of airborne microbes and dust particles using a microfluidic channel for real-time bioaerosol monitoring. *Environmental Science & Technology*, 2009, 43(15): 5857–5863.
- [18] Adams JD, Kim U, Soh HT. Multitarget magnetic activated cell sorter. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2008, 105(47): 18165–18170.
- [19] Shields CW, Livingston CE, Yellen BB, López GP, Murdoch DM. Magnetographic array for the capture and enumeration of single cells and cell pairs. *Biomicrofluidics*, 2014, 8(4): 041101.
- [20] Nishikawa Y, Hosokawa M, Maruyama T, Yamagishi K, Mori T, Takeyama H. Monodisperse picoliter droplets for low-bias and contamination-free reactions in single-cell whole genome amplification. *PLoS One*, 2015, 10(9): e0138733.
- [21] Huang L, Ma F, Chapman A, Lu SJ, Xie XS. Single-cell whole-genome amplification and sequencing: methodology and applications. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 2015, 16(1): 79–102.
- [22] Ning LW, Li ZF, Wang G, Hu W, Hou QM, Tong Y, Zhang M, Chen Y, Qin L, Chen XP, Man HY, Liu PH, He JK. Quantitative assessment of single-cell whole genome amplification methods for detecting copy number variation using hippocampal neurons. *Scientific Reports*, 2015, 5: 11415.
- [23] Fu YS, Li CM, Lu SJ, Zhou WX, Tang FC, Xie XS, Huang YY. Uniform and accurate single-cell sequencing based on emulsion whole-genome amplification. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2015, 112(38): 11923–11928.
- [24] Telenius H, Carter NP, Bebb CE, Nordenskjöld M, Ponder BAJ, Tunnacliffe A. Degenerate oligonucleotide-primed PCR: general amplification of target DNA by a single degenerate primer. *Genomics*, 1992, 13(3): 718–725.
- [25] Wang Y, Navin NE. Advances and applications of single-cell sequencing technologies. *Molecular Cell*, 2015, 58(4): 598–609.
- [26] Arneson N, Hughes S, Houlston R, Done S. Whole-genome amplification by degenerate oligonucleotide primed PCR (DOP-PCR). *Cold Spring Harbor Protocols*, 2008, doi: 10.1101/pdb.prot4919.
- [27] Dean FB, Hosono S, Fang LH, Wu XH, Faruqi AF, Bray-Ward P, Sun ZY, Zong QL, Du YF, Du J, Driscoll M, Song WM, Kingsmore SF, Egholm M, Lasken RS. Comprehensive human genome amplification using multiple displacement amplification. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2002, 99(8): 5261–5266.
- [28] Pan XH, Urban AE, Palejev D, Schulz V, Grubert F, Hu YP, Snyder M, Weissman SM. A procedure for highly specific, sensitive, and unbiased whole-genome amplification. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2008, 105(40): 15499–15504.
- [29] Marcy Y, Ishoey T, Lasken RS, Stockwell TB, Walenz BP, Halpern AL, Beeson KY, Goldberg SM, Quake SR. Nanoliter reactors improve multiple displacement amplification of genomes from single cells. *PLoS Genetics*, 2007, 3(9): e155.
- [30] Zong CH, Lu SJ, Chapman AR, Xie XS. Genome-wide detection of single-nucleotide and copy-number variations of a single human cell. *Science*, 2012, 338(6114): 1622–1626.
- [31] Chen MF, Song PF, Zou D, Hu XS, Zhao SC, Gao SJ, Ling F. Comparison of multiple displacement amplification (MDA) and multiple annealing and looping-based amplification cycles (MALBAC) in single-cell sequencing. *PLoS One*, 2014, 9(12): e114520.

- [32] de Bourcy CFA, De Vlaminc I, Kanbar JN, Wang JB, Gawad C, Quake SR. A quantitative comparison of single-cell whole genome amplification methods. *PLoS One*, 2014, 9(8): e105585.
- [33] Ekblom R, Wolf JBW. A field guide to whole-genome sequencing, assembly and annotation. *Evolutionary Applications*, 2014, 7(9): 1026–1042.
- [34] Huson DH, Richter DC, Mitra S, Auch AF, Schuster SC. Methods for comparative metagenomics. *BMC Bioinformatics*, 2009, 10(Suppl 1): S12.
- [35] Swan BK, Martinez-Garcia M, Preston CM, Sczyrba A, Woyke T, Lamy D, Reinthaler T, Poulton NJ, Masland EDP, Gomez ML, Sieracki ME, DeLong EF, Herndl GJ, Stepanauskas R. Potential for chemolithoautotrophy among ubiquitous bacteria lineages in the dark ocean. *Science*, 2011, 333(6047): 1296–1300.
- [36] Leung K, Zahn H, Leaver T, Konwar KM, Hanson NW, Pagé AP, Lo CC, Chain PS, Hallam SJ, Hansen CL. A programmable droplet-based microfluidic device applied to multiparameter analysis of single microbes and microbial communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2012, 109(20): 7665–7670.
- [37] Rinke C, Schwientek P, Sczyrba A, Ivanova NN, Anderson IJ, Cheng JF, Darling A, Malfatti S, Swan BK, Gies EA, Dodsworth JA, Hedlund BP, Tsiamis G, Sievert SM, Liu WT, Eisen JA, Hallam SJ, Kyrpides NC, Stepanauskas R, Rubin EM, Hugenholtz P, Woyke T. Insights into the phylogeny and coding potential of microbial dark matter. *Nature*, 2013, 499(7459): 431–437.
- [38] Davison M, Hall E, Zare R, Bhaya D. Challenges of metagenomics and single-cell genomics approaches for exploring cyanobacterial diversity. *Photosynthesis Research*, 2015, 126(1): 135–146.
- [39] Martijn J, Schulz F, Zaremba-Niedzwiedzka K, Viklund J, Stepanauskas R, Andersson SGE, Horn M, Guy L, Ettema TJG. Single-cell genomics of a rare environmental alphaproteobacterium provides unique insights into Rickettsiaceae evolution. *The ISME Journal*, 2015, 9(11): 2373–2385.
- [40] Wang TT, Ji YT, Wang Y, Jia J, Li J, Huang S, Han DX, Hu Q, Huang WE, Xu J. Quantitative dynamics of triacylglycerol accumulation in microalgae populations at single-cell resolution revealed by Raman microspectroscopy. *Biotechnology for Biofuels*, 2014, 7(1): 58.
- [41] Zhang Q, Liu YJ, Liu GZ. The preliminary study of single-cell PCR analysis of marine dinoflagellates. *Marine Environmental Science*, 2015, 34(4): 611–615. (in Chinese)
张琦, 刘永健, 柳圭泽. 海洋甲藻的单细胞PCR技术初步研究. *海洋环境科学*, 2015, 34(4): 611–615.

Progress in microbial single-cell genomics for environmental microbiology research-A review

Yi Wang^{1,2}, Peng Xu¹, Xin Dai^{1*}

¹ State Key Laboratory of Microbial Resources, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Science, Beijing 100101, China

² College of Life Science, Hebei Normal University, Shijiazhuang 050024, Hebei Province, China

Abstract: We compared different methods used in single-cell isolation and whole genome amplification of microbial cells, and summarized research progresses in single-cell genomics (SCG) in studying environmental microbes. The studies of single cell and SCG have become one of the hot topics in life sciences in recent years. As a newly developed technology following microbial metagenomics, microbial SCG can efficiently explore large amounts of information of the uncultivable microbial genomics from environment. Generally, following steps need to be taken to obtain microbial SCG: isolation of single microbial cells, whole genome amplification of the single cells, amplicon sequencing, and data analysis. Microbial SCG can be widely used to explore new functional genes that are not detectable by metagenomics and other traditional methods, detect uncultured microbes with extremely low abundance, and study the life evolution of microbial cells.

Keywords: microbial genomics, single-cell genome amplification, multiple displacement amplification

(本文责编: 李磊)

Supported by the Program of the China Ocean Mineral Resources R&D Association (DA125-15-R-02)

*Corresponding author. Tel: +86-10-64807418; E-mail: daix1970@163.com

Received: 2 March 2016; Revised: 18 May 2016; Published online: 28 June 2016