



张卫文, 博士, 天津大学化工学院, 微生物学和生物化工教授, 博士生导师, 合成微生物学实验室主任, 天津大学生物安全及战略研究中心副主任。1996 年博士毕业于中国科学院上海植物生理研究所。2001 年任职于美国北卡罗州 Paradigm 遗传公司, 历任研究科学家和研究项目负责人。2002 年加入美国能源部西北太平洋国家实验室 (Pacific Northwest National Laboratory), 任四级高级研究科学家, 美国能源部重大研究方向共同领导人。2007 年先后任美国亚利桑那州立大学生物设计研究所副教授, 和亚利桑那州立大学生命科学学院客座教授。2012 年任职天津大学化工学院。主要从事光合蓝细菌以及脱硫微生物的合成生物学研究, 以及微生物单细胞研究, 至今发表 SCI 研究论文 160 余篇, 申请中国和美国专利 12 项。

单细胞尺度下的微生物学研究: 意义与方法

陈子熙^{1,2,3}, 陈磊^{1,2,3}, 张卫文^{1,2,3,4*}

¹天津大学化工学院合成微生物学实验室, 天津 300354

²系统生物工程教育部重点实验室, 天津 300354

³化学化工协同创新中心, 天津 300072

⁴天津大学生物安全战略研究中心, 天津 300072

摘要: 最近研究表明, 即便是处于同一种群中的微生物细胞, 在基因转录和翻译、蛋白活性、以及代谢物丰度等多个水平都可能存在显著差异, 说明微生物细胞间存在着多个层次上的异质性; 同时, 传统微生物学研究方法需要将所研究的微生物对象在实验室实现再次培养, 然后对纯培养的微生物种群进行研究, 这样往往造成实验室的研究结果无法真实地反映微生物细胞在自然界中的原始状态, 急需发展新的原位研究手段; 此外, 自然界中的微生物目前只有极少部分可以在实验室中进行培养, 仍有大量微生物无法通过传统方法进行发掘和研究。单细胞尺度微生物学为解决这些微生物学研究中的重要挑战提供了一种新的策略和技术思路, 有望帮助我们更为直观、深入地了解每个细胞内部的状态, 以及其在自然界的生理生态功能。本文对单细胞尺度微生物学研究的意义以及当前单细胞尺度微生物学的研究方法, 特别是新兴的微生物单细胞组学方法进行了介绍。

关键词: 单细胞尺度微生物学, 异质性, 不可培养微生物, 单细胞基因组学, 单细胞转录组学

传统的微生物学研究一般以某一细胞种群作为研究对象, 在群体水平上对该种类细胞进行研究。然而, 近来越来越多的研究发现,

基金项目: 国家自然科学基金(21621004, 31370115); 国家“973 项目”(2014CB745101); 高等学校博士学科点专项科研基金(20120032110020, 20130032120022); 天津市应用基础与前沿技术计划(15JCZDJC32500)

*通信作者。Tel: +86-22-27406394; Fax: +86-22-27406364; E-mail: wwzhang8@tju.edu.cn

收稿日期: 2017-02-12; 修回日期: 2017-03-22; 网络出版日期: 2017-04-01

即使处于同一群体中的微生物细胞也会在基因转录和翻译、蛋白质活性、以及代谢物丰度等多个水平存在着差异,即细胞间的异质性。传统的研究方法由于以群体细胞为研究对象,观测得到的结果实际上是群体内各个细胞状态的平均值,无法反映出细胞间的异质性。此外,传统的微生物学研究由于在群体水平进行,往往依赖于对某一类细胞的分离与纯培养;然而,越来越多的研究发现微生物在自然界中普遍以相互依存的形式存在,分离和获得纯培养技术并不一定对所有的微生物都可行。因而,传统研究方法一方面可能无法反映出微生物在自然界中的真实状态,另一方面也难以对不能实现纯培养体系的目标微生物进行研究^[1]。新兴的研究技术,如宏基因组学和宏转录组学方法等,虽然不需要进行纯培养富集,从一定程度上解决了天然样本的分析问题,但对于复杂群体中微生物细胞间的异质性,以及群落结构的深层次解析仍存在着一定的困难^[2]。

作为一个新兴的研究方向,单细胞尺度微生物学的相关研究方法为解决上述三点问题提出了可行的策略和技术手段:一方面,单细胞水平的分析能很好地反映出种群内部细胞个体状态,进而了解到整个群体的异质性分布;另一方面,单细胞水平的分析不依赖于对细胞的纯培养,能够在对天然样本进行直接分析的同时,解析微生物在自然界复杂环境中的状态。本文重点综述了单细胞尺度微生物学研究的意义,并从微生物单细胞分离与分析两方面综述了当前单细胞尺度微生物学的前沿研究方法,特别是对新兴的各种组学方法在单细胞尺度微生物学领域的应用进行了重点介绍。

1 单细胞水平微生物研究的内容与意义

随着相关技术的发展与完善,单细胞水平研究逐渐成为许多领域的研究热点。虽然相比于动物和植物,微生物没有复杂的器官分化,但是对微生物进行单细胞水平研究有助于我们研究微生物在群落内部的分工、细胞间相互作用、细胞间异质性等关键问题。下面,我们将从异质性、原位分析与不可培养性 3 个方面,概述微生物单细胞水平研究的内容与意义。

1.1 微生物的异质性

在自然界中,由于需要面对复杂的外部环境与各种可能的胁迫条件,微生物通过种群中个体基因型与表型的多样性,保证某些个体在严酷条件下的存活,实现种群的存续^[3]。一般而言,细胞间异质性的来源可分为以下 4 种:基因的随机表达、表型可塑性、基因型可塑性、以及可逆的基因型变异^[4]。研究表明,细胞固有的、外在的表达噪声以及双峰与双稳态机制都可能是基因随机表达的诱因^[4]。表型可塑性^[5]多由于种群内部个体所处的微环境差异,导致细胞间的基因表达差异,并最终反映为表型差异以及群体内部分工。例如:在许多生物膜系统中,氧气、营养成分以及代谢物浓度的分布差异,会使生物膜表面与内部的细胞、生物膜上与培养基中的游离细胞呈现出完全不同的表型^[6-8]。基因型可塑性一般与外界环境的压力相关:在环境胁迫下,群体内部来自同一单克隆的不同子代细胞会发生不同类型的突变;最终,发生有利突变的少量细胞会存活下来,并逐渐形成一个或数个新的亚群,而这些亚群之间可能会互相竞争,也可能长期同时存在^[9-10]。可逆的

基因型变异一般来源于细胞内部的诸多分子机制,如位点特异性重组、甲基化修饰等方式,最终形成微生物的“相变异”(phase variation)。这一过程在致病菌中尤其常见,并往往与致病菌的致病性密切相关。例如:在大肠杆菌中,I型菌毛表达会在感染期间受 *fim* 基因的反转调节^[11];鼠伤寒沙门氏杆菌中,鞭毛由 *fliC* 和 *fliB* 基因合成的鞭毛蛋白构成,细胞通过可逆反转 *fliB* 的启动子区,调控 *fliB* 以及其下游的 *fliA* 基因的表达,FljA 蛋白通过转录后调控的方式抑制 *fliC* 基因的表达,从而实现某一类鞭毛蛋白基因的表达^[12-13]。

尽管上述四类异质性来源已经在某些方面得到了证实,但其中的诸多机理仍未在分子水平得以系统的阐明。相关研究一方面依赖于对微生物表型的实时检测,另一方面也需要通过对目的细胞群体或个体的分离,以进行相关分子水平的深入分析,从而揭示异质性背后的分子机理。

1.2 微生物的原位分析

微生物在自然环境中与实验室纯培养环境中所处的环境往往存在着极大的差异:一方面,纯培养体系的培养条件经过优化,各种营养物质较为充足,而自然环境中,各种营养物质一般较为匮乏,且可能存在着各种抑制生长的物质,致使基因表达谱、蛋白、代谢物种类都与实验室纯培养环境下存在差异;另一方面,微生物在自然界中时时刻刻处于和其他微生物的相互作用中、生物膜系统等复杂系统中,物种之间与种群内部的群感效应(quorum-sensing)、信号传导等与纯培养状态下也有着很大的不同。为解决以上问题,有必要利用实时、非侵入性的研究方法,对上述复杂环境中的微生物进行原位分析,了解微生物细胞在自然界的天然生理状况,这对于微生物生态

学以及环境生物学研究都有着重要的意义。

1.3 不可培养微生物

据估计,目前自然界中的细菌与古细菌仅有不到 1%能够在实验室中进行纯培养。这意味着,传统的基于纯培养的研究方法仅仅揭示了自然界的冰山一角,仍然有许多“暗物质”等待着新的方法去发掘其中的内容,如新的功能型化合物、抗生素、以及新的物种等。另一方面,人们很早就发现,很多微生物、特别是一些病原微生物,能够进入一种被称为“活的但不可培养”的状态^[14-15]。在这种状态下,细胞内代谢活性极低、不能在正常的培养基中生长,但在某些条件下能够通过活化恢复生长能力^[14,16]。并且研究发现,处在这些状态下的某些致病菌仍具有致病性^[17-19]。因此,对这些问题进行分子水平的深入解析,在食品卫生安全、疾病防治等方面都有着重要的意义。

单细胞尺度微生物学的相关研究方法由于可以直接以单一细胞为起始材料,在避免了细胞培养过程的同时,可以从自然界直接获取细胞,并对其“原位”状态进行分析、获知微生物在自然界中最为原始的状态,无疑为解决上述问题提供了有效的工具。例如:早期基于荧光与光谱的方法可以在不破坏细胞的前提下,实时检测群体内异质性分布与个体的表型、转录信息、蛋白质、代谢物等生理指标^[20];而近期的单细胞测序方法可以与适当的细胞分离方法结合,获取群体内每个个体的基因型与表达谱等信息^[21-22]。

2 单细胞尺度微生物学的重要研究方法

相比于动物、植物细胞,微生物细胞的单细

胞尺度分析有着多方面的难点。微生物细胞壁组成相对复杂多样,一方面在 DNA、RNA 提取时难以裂解,另一方面也令很多在动物、植物细胞中可用的外源探针、标记物等无法进入细胞。很多微生物细胞中含有色素,往往限制了诸如荧光蛋白、荧光杂交探针等基于光学的分析方法。此外,微生物细胞,特别是原核微生物细胞体积更小(2–3 μm ; 动物细胞 10–20 μm)^[23],因而胞内 RNA 含量更低(<10 fg),相比动物细胞总 RNA 含量可以达到 10 pg,二者相差 10^3 以上^[22],且原核微生物 mRNA 稳定性差、半衰期短,使得单细胞转录分析的技术难度更大。下面,我们将从荧光与光谱类方法、单细胞尺度微生物的分离与分选方法以及新兴的单细胞组学方法 3 个方面,概述当前单细胞尺度微生物学的前沿研究方法。

2.1 基于荧光与光谱类方法的单细胞分析

传统的荧光与光谱类方法由于能够对目标群体进行实时与非侵入性的检测,在单细胞尺度微生物学的相关研究中有着广泛的应用;并且,由于相关方法可以实现细胞的无损检测,也为后续目标细胞的分离以及后续分析带来了可能。

荧光类方法可利用细胞内部色素的自发荧光、外源转入荧光蛋白基因进行表达,或通过荧光染料对目的细胞群体进行特异性染色,进而对细胞进行检测。常见的研究方法包括荧光原位杂交、多色荧光蛋白、结合特异性染色剂的流式细胞术分析等。例如:Cassona 等人利用荧光报告系统,实现了艰难梭菌中的单细胞基因表达监测,为研究这一常见的致病菌提供了有效的研究手段^[24]; Taniguchi 等人利用 YFP 荧光蛋白在大肠杆菌单细胞中实现了单分子水平的蛋白组学与转录组学分析^[25]。值得一提的是,随着技术的不断发展,复杂的多色流式细胞术、荧光染料与相应的仪器为复杂群

体的高通量分析与高效活体分选提供了可能。

光谱类方法一般包括拉曼光谱分析、微光束分析等。拉曼光谱分析方法利用物质的拉曼效应,可以直接对细胞内各种化合物进行定性、定量分析,并可以结合微液滴与微流控设备等平台进行高通量的分析与活体分选。目前国内外都已有相关的商业化单细胞拉曼分选仪;相比于荧光类方法,拉曼光谱类方法不需要任何标记物,无损检测细胞内的代谢物,对于细胞活力和可培养性都没有要求,在单细胞尺度微生物学的分析工作中有着良好的应用前景^[26–34]。例如:中国科学院青岛生物能源与过程研究所开发了集单细胞拉曼光谱采集、荧光信号采集、显微观测、细胞活体分选等功能于一体的单细胞拉曼光谱分选仪,通过毫秒级拉曼图谱采集技术与拉曼激活细胞弹射技术相结合,在对细胞内化合物进行实时检测的同时,可将特定拉曼表型的细胞从复杂微生物群落中分离并应用于下游分析中^[32–33],并利用这一技术首次在单细胞水平定量表征了微藻产油过程,实现了单细胞精度的微藻细胞群体合成甘油三酯过程的动态定量监测^[31]。微光束分析方法主要包括 X 光光谱、吸收光谱以及离子束方法等,利用微小的激光光束,直接对细胞内的元素进行诸如浓度、化学状态、胞内分布等情况进行分析,从而获知整个群体营养成分的分布异质性^[22]。

2.2 单细胞尺度微生物的分离与分选方法

目前,单细胞尺度微生物学研究中常见的细胞分离与分选方法主要有:梯度稀释、细胞捕获、显微操作、流式分选以及微流控芯片技术等。其中,梯度稀释与显微操作方法多用于常规的单细胞分离,其过程具有随机性,难以进行特异性分选;流式分选与微流控芯片技术由于多采用自动

化机器，一方面分选效率有着明显的提高，另一方面可以通过与荧光、光谱类检测方法结合，对特定表型细胞进行特异性分选。

梯度稀释所需的设备与操作都相对简单，但单细胞的分选成功率并不高^[35]。显微操作技术一般包括机械方法与光学方法^[36-37]，通过在显微镜下选取，可以准确分离出感兴趣的细胞个体；然而，传统显微操作技术分选通量低，且手动的显微操作技术对操作人员有一定的要求；而机械或光学方法都可能对细胞造成损伤，影响后续分析的准确性。基于流式细胞仪的细胞分选可以通过细胞大小、形态、自发荧光或特异性染色等方式，在表型分析的同时高效分选出不同亚群的细胞^[38]，在微生物学、环境生物学等方面有着广泛的应用。但大型高效的分选型流式细胞仪往往价格昂贵，并且需要专业的操作人员进行实验与维护。基于微流控芯片技术的单细胞分离是近几年来较为主流与热门的研究方法，一方面可以与上述几种方法相结合，提高细胞分离的准确性与通量，另一方面也可以与下游的分析过程，如基因组学或转录组学分析相结合，在实现同步高通量分选与分析的同时，提高分析的准确性^[39]。目前，已有成熟的商业化微流控芯片，广泛用于单细胞基因组学、转录组学的分析工作中^[40]；同时，也有很多实验室基于自己的研究对象与研究目的，开发了多样化的微流控芯片设备^[41-44]，例如：中国科学院青岛生物能源与过程研究所近期开发了名为“FOCOT” (Facile One-Cell-One-Tube)的微流控平台，能够精确、高速、低成本地分离获取单个微生物细胞，同时有效避免了环境中微生物带来的污染^[43]；中科院微生物研究所近期也开发了名为“MSP” (Microfluidic Streak Plate)的方法，通过微流控设备与传统培养皿的结合，实现了微生物

细胞的高通量分离与培养，并将其应用于土壤微生物的分离与培养，发现了多种能够高效降解多环芳烃的微生物^[44]。此外，目前也有商业化的微流控芯片 3D 打印系统，可直接在实验室中将设计好的芯片通过 3D 打印技术生成^[45]，为多样化的研究提供了便利。

2.3 单细胞组学方法

随着各方面检测手段的发展，科学家们可以对细胞内某一类物质同时进行定性与定量分析，各种组学技术与系统生物学方法得到了迅速的发展。目前，微生物单细胞组学的相关研究主要集中于利用单细胞基因组技术对自然界中不可培养微生物进行分析^[2]、利用单细胞转录组技术研究微生物群体中的基因表达异质性^[22,46]、以及利用高精度质谱技术进行单细胞蛋白组学与代谢组学的相关研究^[47]等几个领域。

微生物中的单细胞基因组学研究最早见于 2007 年^[48]，Marcy 等人利用微流控芯片对人类牙菌斑上的细菌进行了分离，并通过多重置换扩增(MDA)的方法实现了单细胞基因组的测序工作，发现了属于 TM7 门下的一些新的、从未被培养或测序的新物种。这一开创性的工作证明了利用单细胞基因组测序的方法对不可培养微生物进行分析的可行性。随后，又有多项研究利用相似的方法，从土壤、温泉、人体口腔黏膜、医院水池的生物膜等环境中发现了更多新的物种^[49-52]。美国能源部联合基因组研究院的研究人员利用流式细胞仪分选分离方法，对来自不同环境的微生物进行了单细胞测序，得到了 200 多个细胞的基因组草图，并从中发现了一个新的嘌呤合成途径^[53]。这些研究表明，将单细胞基因组测序应用于自然界中不可培养微生物的分析，能够帮助我们在发掘新物种的同时，从自然界中寻找新的功能性化合物与

代谢途径, 并更为深入地认识自然界中生物之间的关系。

由于目前测序技术对样品量的需求, 对细胞基因组的测序必须首先经过扩增放大过程。因此, 扩增过程的准确性对于测序结果的准确性有着决定性的影响。目前, 单细胞基因组学研究中常用的扩增方法主要有: 基于 PCR 的扩增方法, 如 DOP-PCR; 等温扩增方法, 如 MDA; 以及多种策略混合的方法, 如 MALBAC。尽管一些实验表明, MALBAC 方法在动物细胞中有着更小的扩增偏倚性; 但在微生物的相关研究中, MDA 方法往往有着更好的效果^[54]。

相比单细胞基因组分析, 单细胞基因表达分析能够获得更多微生物细胞的生理功能信息。近期的研究已经实现了对于单个微生物细胞的基因表达分析, 例如: 已有报道利用 RT-qPCR 的方法对大肠杆菌^[23]、硅藻^[55]、脱硫弧菌^[7,56]、蓝细菌^[57]等微生物单细胞中的基因表达进行研究, 这些方法实现了对少量基因的表达异质性分析。然而, 这些方法一方面依赖于基因组信息进行特异性引物设计, 另一方面难以对细胞内基因表达进行全面分析。因此, 需要发展单细胞转录组学方法, 实现更为便捷、高效的单细胞基因表达分析。

微生物中的单细胞转录组学研究目前集中于相关方法学的开发与细胞间异质性的研究。其中, 真核微生物与原核微生物之间所采用的研究方法存在着一些差异: 一方面, 由于细胞中 rRNA 与 tRNA 占总 RNA 的 90% 以上, 但在测序分析中研究者往往并不关心这两种 RNA, 基于对测序数据有效利用的考虑, 需要在建库过程中尽量减少这两种 RNA 的反转录。另一方面, 真核微生物的 mRNA 普遍具有 poly-A 尾结构, 而 rRNA 与 tRNA

不具有这种结构, 因此能够在利用 oligo-dT 引物进行反转录的同时, 去掉多数的 rRNA 与 tRNA; 而原核生物的 mRNA 由于不具有这一结构, 需要在反转录时采用随机引物, 会不可避免地反转录 rRNA 与 tRNA, 影响 mRNA 在最后测序数据中所占比例。因此, 对真核微生物的研究理论上可以直接采用哺乳动物中使用的相关方法, 例如: de Bekker 等人通过 Ribo-SPIA 方法的扩增、利用基因芯片对黑曲霉的单菌丝进行了转录组的分析^[46]; 而原核微生物的相关研究方法还在开发与改进中。Kang 等人利用基因芯片对伯克氏菌进行了单细胞转录组的分析^[21], 通过 5' 磷酸依赖的外切酶处理以及 Phi29 聚合酶进行等温滚环扩增的方法, 实现了低偏倚性与高检出率的单细胞转录组分析。然而, 受限於基因芯片自身的弊端, 灵敏度较低且无法对未知物种进行分析, 难以应用于不可培养微生物。笔者所在天津大学研究团队近期开发了基于 RNA-Seq 的原核微生物单细胞转录组分析方法, 该方法在对蓝细菌集胞藻 PCC6803 单细胞的分析中实现了良好的检出率, 并且在缺氮胁迫下的蓝细菌细胞的分析中, 发现细胞间基因表达异质性随胁迫时间的增加而增加; 其中“移动元件”相关功能类别下的基因表达异质性增加最为明显, 表明了微生物群体在胁迫条件下通过提高整体异质性的方式, 争取少量个体的存活以及种群的存续^[22]。此外, 相关研究通过对被致病菌感染的宿主进行单细胞分析, 实现了单细胞水平宿主-病原体的转录组共分析^[58-59], 研究结果表明病原体间的异质性影响宿主细胞间免疫应答的异质性。这些研究在探寻宿主对致病菌的免疫应答机制等问题的同时, 也为相关研究提供了方法性的指引^[60]。

微生物单细胞蛋白组学与代谢组学目前主要

利用微流芯片、荧光蛋白与高精度质谱解析结合的方法进行研究。由于蛋白质、代谢物与核酸不同、不能进行体外扩增,因此在检测上需要更为精细的方法^[61-63]。例如:Jaschinski 等人利用激光解吸离子化质谱方法,对多种硅藻实现了单细胞水平的代谢物检测^[47];Newman 等人利用流式细胞仪与绿色荧光蛋白标记的方法,对酿酒酵母进行了单细胞蛋白组的分析,表明了群体中的蛋白噪声^[64];Taniguchi 等人利用 YFP 荧光蛋白在大肠杆菌单细胞中实现了单分子水平的蛋白组学与转录组学分析^[25]。此外,近几年来新兴的质谱流式细胞术,结合了质谱检测方法的高精度与流式细胞术的高通量,通过金属标记抗体的方法,能够实现动物细胞中单细胞水平超过 40 个参数的 mRNA 与蛋白高通量检测^[65]。不过,针对微生物的相关抗体还有待开发,限制了这一技术在微生物单细胞分析中的应用。

此外,相较于传统的、基于群体细胞的各种组学数据分析,单细胞组学数据在分析上有着新的问题与挑战。例如:单细胞基因组测序往往有更高的非均一性以及较高的测序错误与嵌合;在针对自然样本的单细胞测序中,往往缺少完整的参考基因组,需要从中去除可能的污染,并对拼接结果的完整性进行评估;单细胞转录组测序在数据质控、差异表达分析等步骤中都与传统测序有着不同:单细胞转录组样本的低起始量使测序结果中有着更大的技术噪声,如扩增偏倚、外源污染等,需要在数据质控步骤进行合理的过滤;由于单细胞分析没有重复样,对测序结果的标准化的或归一化流程影响着后续分析的准确性;此外,单细胞分析往往更为关注群体的异质性、细胞亚群以及少数群体微进化等信息,如何从测序数据中发掘出相关信息,决定了最后结论的真实性与

准确性。相比于动物、植物,目前针对微生物的单细胞生物信息学算法相对较少,主要研究集中于微生物单细胞基因组测序数据的拼接与拼接结果完整性的评估,如 SPAdes、BayesHammer 以及 CheckM 等^[66-70],为更准确地解析单细胞测序分析结果提供了重要的技术支持。微生物单细胞转录组学方面,相关研究仍集中于实验技术开发,目前尚无针对性的生物信息学算法。此外,由于微生物的基因组相对简单,理论上针对高等动物的单细胞转录组生物信息学算法^[71-72]经过适当的修改后可以应用于微生物单细胞分析中,有助于微生物单细胞转录组研究的进一步深入。

3 总结和展望

单细胞尺度微生物学的相关方法与研究,对于我们更好地认识自然界中微生物种类、群落结构、种群内部分工、基因表达与异质性,探究致病菌致病机理、微生物耐药性等重大关键问题背后的答案有着重要的价值。值得提出的是,对于当前受到广泛重视的微生物组研究工作,单细胞尺度微生物学的相关研究方法也将有着重要的意义。例如,尽管目前的宏组学方法能够直接对自然样本进行分析,但由于当前高通量测序读长以及测序后数据组装算法的限制,无法对样本的异质性进行分析,难以对复杂群落结构进行解析,无法解析物种与基因之间的关系^[73];而宏基因组结合单细胞水平的分析策略则可以较好地避免以上问题,既可以作为宏组学研究的补充,亦可以作为绘制生物群落精细图谱、解析物种间关系等关键问题的重要分析手段^[74]。近年来,多个研究小组利用单细胞基因组测序的方法,发现了宏基因组学组装无法发现的病毒等物种信息,揭示了

细菌、原生生物与病毒之间的相互作用关系^[75-79]。

作为一个新兴的前沿领域, 单细胞尺度微生物学的发展目前仍存在着诸多挑战, 例如: 受限微生物更为复杂的细胞壁结构与更小的体积, 以及目前各种类型检测方法的限制, 微生物单细胞分析的工作相较于哺乳动物单细胞分析难度更大, 且稳定的商业化、流程化检测方法的发展远不及哺乳动物细胞; 但同时, 这一领域也拥有极为广阔的前景: 一方面, 哺乳动物单细胞分析的许多已有方法都可以为微生物的方法改进提供参考; 另一方面, 新的研究技术的发展, 如三代测序与四代测序技术、质谱流式细胞术、微流控芯片技术等, 都为微生物单细胞分析提供了更为广阔的前景。总之, 发展单细胞尺度微生物学, 将帮助我们更为清晰地认识我们所处的世界, 了解我们所处的环境, 也将帮助我们加深对微生物细胞状态、基因表达调控乃至对疾病病理的认识, 在解决生命科学领域中的许多重大问题的同时, 为传统微生物学研究带来新的思路、新的视野, 推进相关领域的发展。

参 考 文 献

- [1] Omsland A, Cockrell DC, Howe D, Fischer ER, Virtaneva K, Sturdevant DE, Porcella SF, Heinzen RA. Host cell-free growth of the Q fever bacterium *Coxiella burnetii*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2009, 106(11): 4430-4434.
- [2] Gawad C, Koh W, Quake SR. Single-cell genome sequencing: current state of the science. *Nature Reviews Genetics*, 2016, 17(3): 175-188.
- [3] Davis KM, Isberg RR. Defining heterogeneity within bacterial populations via single cell approaches. *Bioessays*, 2016, 38(8): 782-790.
- [4] Roberfroid S, Vanderleyden J, Steenackers H. Gene expression variability in clonal populations: causes and consequences. *Critical Reviews in Microbiology*, 2016, 42(6): 969-984.
- [5] Viney M, Reece SE. Adaptive noise. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 2013, 280(1767): 20131104.
- [6] Hermans K, Nguyen TLA, Roberfroid S, Schoofs G, Verhoeven T, De Coster D, Vanderleyden J, De Keersmaecker SCJ. Gene expression analysis of monospecies *Salmonella* Typhimurium biofilms using differential fluorescence induction. *Journal of Microbiological Methods*, 2011, 84(3): 467-478.
- [7] Qi ZH, Chen L, Zhang WW. Comparison of transcriptional heterogeneity of eight genes between batch *Desulfovibrio vulgaris* biofilm and planktonic culture at a single-cell level. *Frontiers in Microbiology*, 2016, 7: 597.
- [8] Robijns SCA, Roberfroid S, van Puyvelde S, de Pauw B, Uceda Santamaría E, de Weerd A, de Coster D, Hermans K, de Keersmaecker SCJ, Vanderleyden J, Steenackers HPL. A GFP promoter fusion library for the study of *Salmonella* biofilm formation and the mode of action of biofilm inhibitors. *Biofouling*, 2014, 30(5): 605-625.
- [9] Barrick JE, Lenski RE. Genome-wide mutational diversity in an evolving population of *Escherichia coli*. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 2009, 74: 119-129.
- [10] Barrick JE, Lenski RE. Genome dynamics during experimental evolution. *Nature Reviews Genetics*, 2013, 14(12): 827-839.
- [11] Gally DL, Bogan JA, Eisenstein BI, Blomfield IC. Environmental regulation of the fim switch controlling type 1 fimbrial phase variation in *Escherichia coli* K-12: effects of temperature and media. *Journal of Bacteriology*, 1993, 175(19): 6186-6193.
- [12] Bonifield HR, Hughes KT. Flagellar phase variation in *Salmonella enterica* is mediated by a posttranscriptional control mechanism. *Journal of Bacteriology*, 2003, 185(12): 3567-3574.
- [13] Yamamoto S, Kutsukake K. FljA-mediated posttranscriptional control of phase 1 flagellin expression in flagellar phase variation of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. *Journal of Bacteriology*, 2006, 188(3): 958-967.
- [14] Oliver JD. Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 2010, 34(4): 415-425.
- [15] Xu HS, Roberts N, Singleton FL, Attwell RW, Grimes DJ, Colwell RR. Survival and viability of nonculturable *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* in the estuarine and

- marine environment. *Microbial Ecology*, 1982, 8(4): 313–323.
- [16] Oliver JD. The viable but nonculturable state in bacteria. *Journal of Microbiology*, 2005, 43(1): 93–100.
- [17] Colwell RR, Brayton P, Herrington D, Tall B, Huq A, Levine MM. Viable but non-culturable *Vibrio cholerae* O1 revert to a cultivable state in the human intestine. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 1996, 12(1): 28–31.
- [18] Colwell RR, Brayton PR, Grimes DJ, Roszak DB, Huq SA, Palmer LM. Viable but non-culturable *Vibrio cholerae* and related pathogens in the environment: implications for release of genetically engineered microorganisms. *Nature Biotechnology*, 1985, 3(9): 817–820.
- [19] Oliver JD, Bockian R. *In vivo* resuscitation, and virulence towards mice, of viable but nonculturable cells of *Vibrio vulnificus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 1995, 61(7): 2620–2623.
- [20] Brehm-Stecher BF, Johnson EA. Single-cell microbiology: tools, technologies, and applications. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2004, 68(3): 538–559.
- [21] Kang Y, Norris MH, Zarzycki-Siek J, Nierman WC, Donachie SP, Hoang TT. Transcript amplification from single bacterium for transcriptome analysis. *Genome Research*, 2011, 21(6): 925–935.
- [22] Wang JX, Chen L, Chen ZX, Zhang WW. RNA-seq based transcriptomic analysis of single bacterial cells. *Integrative Biology*, 2015, 7(11): 1466–1476.
- [23] Gao WM, Zhang WW, Meldrum DR. RT-qPCR based quantitative analysis of gene expression in single bacterial cells. *Journal of Microbiological Methods*, 2011, 85(3): 221–227.
- [24] Cassona CP, Pereira F, Serrano M, Henriques AO. A fluorescent reporter for single cell analysis of gene expression in *Clostridium difficile*//Roberts AP, Mullany P. *Clostridium Difficile*. New York: Springer, 2016: 69–90.
- [25] Taniguchi Y, Choi PJ, Li GW, Chen HY, Babu M, Hearn J, Emili A, Xie XS. Quantifying *E. coli* proteome and transcriptome with single-molecule sensitivity in single cells. *Science*, 2010, 329(5991): 533–538.
- [26] Huang WE, Griffiths RI, Thompson IP, Bailey MJ, Whiteley AS. Raman microscopic analysis of single microbial cells. *Analytical Chemistry*, 2004, 76(15): 4452–4458.
- [27] Huang WE, Ward AD, Whiteley AS. Raman tweezers sorting of single microbial cells. *Environmental Microbiology Reports*, 2009, 1(1): 44–49.
- [28] Lau AY, Lee LP, Chan JW. An integrated optofluidic platform for Raman-activated cell sorting. *Lab on a Chip*, 2008, 8(7): 1116–1120.
- [29] Pascut FC, Goh HT, George V, Denning C, Notingher I. Toward label-free Raman-activated cell sorting of cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells. *Journal of Biomedical Optics*, 2011, 16(4): 045002.
- [30] Song YZ, Yin HB, Huang WE. Raman activated cell sorting. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2016, 33: 1–8.
- [31] 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: 58.
- [32] Wang Y, Ji YT, Wharfe ES, Meadows RS, March P, Goodacre R, Xu J, Huang WE. Raman activated cell ejection for isolation of single cells. *Analytical Chemistry*, 2013, 85(22): 10697–10701.
- [33] Zhang PR, Ren LH, Zhang X, Shan YF, Wang Y, Ji YT, Yin HB, Huang WE, Xu J, Ma B. Raman-activated cell sorting based on dielectrophoretic single-cell trap and release. *Analytical Chemistry*, 2015, 87(4): 2282–2289.
- [34] Zhang Q, Zhang PR, Gou HL, Mou CB, Huang WE, Yang ML, Xu J, Ma B. Towards high-throughput microfluidic Raman-activated cell sorting. *Analyst*, 2015, 140(18): 6163–6174.
- [35] Shi X, Gao WM, Wang JX, Chao SH, Zhang WW, Meldrum DR. Measuring gene expression in single bacterial cells: recent advances in methods and micro-devices. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2015, 35(4): 448–460.
- [36] Enger J, Goksör M, Ramser K, Hagberg P, Hanstorp D. Optical tweezers applied to a microfluidic system. *Lab on a Chip*, 2004, 4(3): 196–200.
- [37] Munce NR, Li JZ, Herman PR, Lilge L. Microfabricated system for parallel single-cell capillary electrophoresis. *Analytical Chemistry*, 2004, 76(17): 4983–4989.
- [38] Davey HM, Kell DB. Flow cytometry and cell sorting of heterogeneous microbial populations: the importance of single-cell analyses. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 1996, 60(4): 641–696.
- [39] Wu AR, Neff NF, Kalisky T, Dalerba P, Treutlein B, Rothenberg ME, Mburu FM, Mantalas GL, Sim S, Clarke MF, Quake SR. Quantitative assessment of single-cell RNA-sequencing methods. *Nature Methods*, 2014, 11(1): 41–46.
- [40] Streets AM, Zhang XN, Cao C, Pang YH, Wu XL, Xiong L, Yang L, Fu YS, Zhao L, Tang FH, Huang YY. Microfluidic single-cell whole-transcriptome sequencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of*

- America*, 2014, 111(19): 7048–7053.
- [41] Macosko EZ, Basu A, Satija R, Nemes J, Shekhar K, Goldman M, Tirosh I, Bialas AR, Kamitaki N, Martersteck EM, Trombetta JJ, Weitz DA, Sanes JR, Shalek AK, Regev A, McCarroll SA. Highly parallel genome-wide expression profiling of individual cells using nanoliter droplets. *Cell*, 2015, 161(5): 1202–1214.
- [42] Mazutis L, Gilbert J, Ung WL, Weitz DA, Griffiths AD, Heyman JA. Single-cell analysis and sorting using droplet-based microfluidics. *Nature Protocols*, 2013, 8(5): 870–891.
- [43] Zhang Q, Wang TT, Zhou Q, Zhang P, Gong YH, Gou HL, Xu J, Ma B. Development of a facile droplet-based single-cell isolation platform for cultivation and genomic analysis in microorganisms. *Scientific Reports*, 2017, 7: 41192.
- [44] Jiang CY, Dong LB, Zhao JK, Hu XF, Shen CH, Qiao YX, Zhang XY, Wang YP, Ismagilov RF, Liu SJ, Du WB. High-throughput single-cell cultivation on microfluidic streak plates. *Applied and Environmental Microbiology*, 2016, 82(7): 2210–2218.
- [45] Bhattacharjee N, Urrios A, Kang S, Folch A. The upcoming 3D-printing revolution in microfluidics. *Lab on a Chip*, 2016, 16(10): 1720–1742.
- [46] de Bekker C, Bruning O, Jonker MJ, Breit TM, Wösten HAB. Single cell transcriptomics of neighboring hyphae of *Aspergillus niger*. *Genome Biology*, 2011, 12(8): R71.
- [47] Jaschinski T, Helfrich EJM, Bock C, Wolfram S, Svatoš A, Hertweck C, Pohnert G. Matrix-free single-cell LDI-MS investigations of the diatoms *Coscinodiscus granii* and *Thalassiosira pseudonana*. *Journal of Mass Spectrometry*, 2014, 49(2): 136–144.
- [48] Marcy Y, Ouverney C, Bik EM, Lösekann T, Ivanova N, Martin HG, Szeto E, Platt D, Hugenholtz P, Relman DA, Quake SR. Dissecting biological “dark matter” with single-cell genetic analysis of rare and uncultivated TM7 microbes from the human mouth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2007, 104(29): 11889–11894.
- [49] Campbell JH, O'Donoghue P, Campbell AG, Schwientek P, Sczyrba A, Woyke T, Söll D, Podar M. UGA is an additional glycine codon in uncultured SR1 bacteria from the human microbiota. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2013, 110(14): 5540–5545.
- [50] Dodsworth JA, Blainey PC, Murugapiran SK, Swingley WD, Ross CA, Tringe SG, Chain PSG, Scholz MB, Lo CC, Raymond J, Quake SR, Hedlund BP. Single-cell and metagenomic analyses indicate a fermentative and saccharolytic lifestyle for members of the OP9 lineage. *Nature Communications*, 2013, 4: 1854.
- [51] McLean JS, Lombardo MJ, Badger JH, Edlund A, Novotny M, Yee-Greenbaum J, Vyahhi N, Hall AP, Yang Y, Dupont CL, Ziegler MG, Chitsaz H, Allen AE, Yooseph S, Tesler G, Pevzner PA, Friedman RM, Neilson KH, Venter JC, Lasken RS. Candidate phylum TM6 genome recovered from a hospital sink biofilm provides genomic insights into this uncultivated phylum. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2013, 110(26): E2390–E2399.
- [52] Podar M, Abulencia CB, Walcher M, Hutchison D, Zengler K, Garcia JA, Holland T, Cotton D, Hauser L, Keller M. Targeted access to the genomes of low-abundance organisms in complex microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73(10): 3205–3214.
- [53] 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.
- [54] de Bourcy CFA, De Vlaminck 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.
- [55] Shi X, Gao WM, Chao SH, Zhang WW, Meldrum DR. Monitoring the single-cell stress response of the diatom *Thalassiosira pseudonana* by quantitative real-time reverse transcription-PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 2013, 79(6): 1850–1858.
- [56] Qi ZH, Pei GS, Chen L, Zhang WW. Single-cell analysis reveals gene-expression heterogeneity in syntrophic dual-culture of *Desulfovibrio vulgaris* with *Methanosarcina barkeri*. *Scientific Reports*, 2014, 4: 7478.
- [57] Shi X, Lin LI, Chen SY, Chao SH, Zhang WW, Meldrum DR. Real-time PCR of single bacterial cells on an array of adhering droplets. *Lab on a Chip*, 2011, 11(13): 2276–2281.
- [58] Avraham R, Haseley N, Brown D, Penaranda C, Jijon HB, Trombetta JJ, Satija R, Shalek AK, Xavier RJ, Regev A, Hung DT. Pathogen cell-to-cell variability drives heterogeneity in host immune responses. *Cell*, 2015, 162(6): 1309–1321.
- [59] Shalek AK, Satija R, Shuga J, Trombetta JJ, Gennert D, Lu D, Chen PL, Gertner RS, Gaublotte JT, Yosef N, Schwartz S,

- Fowler B, Weaver S, Wang J, Wang XH, Ding RH, Raychowdhury R, Friedman N, Hachohen N, Park H, May AP, Regev A. Single-cell RNA-seq reveals dynamic paracrine control of cellular variation. *Nature*, 2014, 510(7505): 363–369.
- [60] Westermann AJ, Gorski SA, Vogel J. Dual RNA-seq of pathogen and host. *Nature Reviews Microbiology*, 2012, 10(9): 618–630.
- [61] Gao DW, Huang XL, Tao Y. A critical review of NanoSIMS in analysis of microbial metabolic activities at single-cell level. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2016, 36(5): 884–890.
- [62] Musat N, Foster R, Vagner T, Adam B, Kuypers MMM. Detecting metabolic activities in single cells, with emphasis on nanoSIMS. *FEMS Microbiology Reviews*, 2012, 36(2): 486–511.
- [63] Zimmermann M, Escrig S, Hübschmann T, Kirf MK, Brand A, Inglis RF, Musat N, Müller S, Meibom A, Ackermann M, Schreiber F. Phenotypic heterogeneity in metabolic traits among single cells of a rare bacterial species in its natural environment quantified with a combination of flow cell sorting and NanoSIMS. *Frontiers in Microbiology*, 2015, 6: 243.
- [64] Newman JRS, Ghaemmaghami S, Ihmels J, Breslow DK, Noble M, DeRisi JL, Weissman JS. Single-cell proteomic analysis of *S. cerevisiae* reveals the architecture of biological noise. *Nature*, 2006, 441(7095): 840–846.
- [65] Frei AP, Bava FA, Zunder ER, Hsieh EWY, Chen SY, Nolan GP, Gherardini PF. Highly multiplexed simultaneous detection of RNAs and proteins in single cells. *Nature Methods*, 2016, 13(3): 269–275.
- [66] Bankevich A, Nurk S, Antipov D, Gurevich AA, Dvorkin M, Kulikov AS, Lesin VM, Nikolenko SI, Pham S, Prjibelski AD, Pyshkin AV, Sirotkin AV, Vyahhi N, Tesler G, Alekseyev MA, Pevzner PA. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *Journal of Computational Biology*, 2012, 19(5): 455–477.
- [67] Movahedi NS, Embree M, Nagarajan H, Zengler K, Chitsaz H. Efficient synergistic single-cell genome assembly. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2016, 4: 42.
- [68] Nikolenko SI, Korobeynikov AI, Alekseyev MA. BayesHammer: bayesian clustering for error correction in single-cell sequencing. *BMC Genomics*, 2013, 14(S1): S7.
- [69] Nurk S, Bankevich A, Antipov D, Gurevich AA, Korobeynikov A, Lapidus A, Prjibelski AD, Pyshkin A, Sirotkin A, Sirotkin Y, Stepanauskas R, Clingenpeel SR, Woyke T, McLean JS, Lasken R, Tesler G, Alekseyev MA, Pevzner PA. Assembling single-cell genomes and mini-metagenomes from chimeric MDA products. *Journal of Computational Biology*, 2013, 20(10): 714–737.
- [70] Parks DH, Imelfort M, Skennerton CT, Hugenholtz P, Tyson GW. CheckM: assessing the quality of microbial genomes recovered from isolates, single cells, and metagenomes. *Genome Research*, 2015, 25(7): 1043–1055.
- [71] Poirion OB, Zhu X, Ching T, Garmire L. Single-cell transcriptomics bioinformatics and computational challenges. *Frontiers in Genetics*, 2016, 7: 163.
- [72] Bacher R, Kendziorowski C. Design and computational analysis of single-cell RNA-sequencing experiments. *Genome Biology*, 2016, 17(1): 63.
- [73] Kodzius R, Gojobori T. Single-cell technologies in environmental omics. *Gene*, 2016, 576(2): 701–707.
- [74] Ji PF, Zhang YM, Wang JF, Zhao FQ. MetaSort untangles metagenome assembly by reducing microbial community complexity. *Nature Communications*, 2017, 8: 14306.
- [75] Martinez-Garcia M, Brazel D, Poulton NJ, Swan BK, Gomez ML, Masland D, Sieracki ME, Stepanauskas R. Unveiling *in situ* interactions between marine protists and bacteria through single cell sequencing. *The ISME Journal*, 2012, 6(3): 703–707.
- [76] Roux S, Hallam SJ, Woyke T, Sullivan MB. Viral dark matter and virus-host interactions resolved from publicly available microbial genomes. *eLife*, 2015, 4: e08490.
- [77] Roux S, Hawley AK, Torres Beltran M, Scofield M, Schwientek P, Stepanauskas R, Woyke T, Hallam SJ, Sullivan MB. Ecology and evolution of viruses infecting uncultivated SUP05 bacteria as revealed by single-cell- and meta-genomics. *eLife*, 2014, 3: e03125.
- [78] Tadmor AD, Ottesen EA, Leadbetter JR, Phillips R. Probing individual environmental bacteria for viruses by using microfluidic digital PCR. *Science*, 2011, 333(6038): 58–62.
- [79] Yoon HS, Price DC, Stepanauskas R, Rajah VD, Sieracki ME, Wilson WH, Yang EC, Duffy S, Bhattacharya D. Single-cell genomics reveals organismal interactions in uncultivated marine protists. *Science*, 2011, 332(6030): 714–717.

Microbiology at single-cell scale: significance and approaches

Zixi Chen^{1,2,3}, Lei Chen^{1,2,3}, Weiwen Zhang^{1,2,3,4*}

¹ Laboratory of Synthetic Microbiology, School of Chemical Engineering & Technology, Tianjin University, Tianjin 300354, China

² Key Laboratory of Systems Bioengineering, Ministry of Education, Tianjin 300354, China

³ Collaborative Innovation Center of Chemical Science and Engineering, Tianjin 300072, China

⁴ Center for Biosafety Research and Strategy, Tianjin University, Tianjin 300072, China

Abstract: Recent studies have shown that even in the same population, there might be significant differences among individual cells at both cellular and molecular levels, indicating multiple levels of heterogeneity in microbial cells. Meanwhile, depending on establishing pure culture in the laboratory for the targeted microbes, traditional microbiology approaches are unable to present the original state of microorganisms in natural environments. Moreover, so far only small number of microbial species is cultivated successfully in the laboratory, leaving a great deal of microbial information untouched. Single-cell microbiology can be effective tools for addressing these issues and providing better and in-depth understanding of state of microbial cells. In this mini-review, we briefly introduce the significance of single-cell microbiology, and summarize current state-of-the-art methodologies in this new research area, especially the emerging single-cell omics tools for microbial research.

Keywords: single-cell microbiology, heterogeneity, unculturable microorganisms, single-cell genomics, single-cell transcriptomics

(本文责编: 李磊)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (21621004, 31370115), by the National Basic Research Program of China (2014CB745101), by the Doctoral Program of Higher Education of China (20120032110020, 20130032120022) and by the Tianjin Municipal Science and Technology Commission (15JCZDJC32500)

*Corresponding author. Tel: +86-22-27406394; Fax: +86-22-27406364; E-mail: wwzhang8@tju.edu.cn

Received: 12 February 2017; Revised: 22 March 2017; Published online: 1 April 2017