

# 微生物流式分选的单细胞样品制备及存活率提高的方法优化

王丽贤<sup>1</sup>, 张玥<sup>1</sup>, 夏海容<sup>2</sup>, 涂然<sup>3</sup>, 王猛<sup>\*1</sup>

1 中国科学院天津工业生物技术研究所 中国科学院低碳合成工程生物学重点实验室, 天津 300308

2 中国科学院天津工业生物技术研究所技术支撑中心, 天津 300308

3 重庆工商大学环境与资源学院, 重庆 400067

王丽贤, 张玥, 夏海容, 涂然, 王猛. 微生物流式分选的单细胞样品制备及存活率提高的方法优化[J]. 微生物学通报, 2023, 50(11): 5068-5083.

WANG Lixian, ZHANG Yue, XIA Hairong, TU Ran, WANG Meng. Preparation of single cell suspension and survival rate improvement of microorganisms in fluorescence-activated cell sorting[J]. Microbiology China, 2023, 50(11): 5068-5083.

**摘要:** 【背景】以流式细胞技术为代表的高通量筛选技术能够高效筛选具有目标性状的微生物工程菌株。在流式分选中微生物的粘连会造成分析数据不准确, 分选纯度降低, 因此快速简便的单细胞样品制备是流式检测的关键。优势菌大多是通过筛选偶联荧光蛋白的随机突变库获得, 阳性率低, 杂质和死细胞的自发荧光较强, 容易混入分选门内造成存活率降低, 亟须提高分选存活率的方法。【目的】建立一种简便的微生物流式分选的单细胞样品制备方法, 并通过碘化丙啶(propidium iodide, PI)染色提高分选样品存活率。【方法】分别在大肠杆菌、枯草芽孢杆菌、谷氨酸棒状杆菌和酵母菌4种底盘细胞中探索超声波、消化酶、表面活性剂及超声-表面活性剂联合作用4种方式对单细胞制备效率的影响。提高微生物流式分选存活率, 用常压室温等离子诱变(atmospheric and room temperature plasma, ARTP)技术处理含有绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)的酿酒酵母HZ848(简称HZ848-GFP), 形成不同强度GFP文库后, 按照GFP强度分选全细胞和PI染色阴性细胞的前0.5%, 统计单细胞存活率。【结果】酵母细胞分散条件为: 0.01% Tween-80联合超声1 min, 单细胞率达到88%以上, PI染色细胞破损率<1.4%。谷氨酸棒状杆菌单细胞分散条件为: 0.01% Tween-80联合超声5 min, 单细胞率达到97%以上, PI染色细胞破损率<1%。分选存活率结果表明, 未用PI染色的酿酒酵母分选后单细胞存活率是4.3%, 用PI染色去除死细胞后再分选单细胞存活率是18.3%, 后者是前者的4.3倍, 且具有显著性差异。【结论】本

资助项目: 国家重点研发计划(2021YFC2100201, 2021YFC2103302); 国家自然科学基金(32101186); 天津市合成生物技术创新能力提升行动(TSBICIP-PTJS-003)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2021YFC2100201, 2021YFC2103302), the National Natural Science Foundation of China (32101186), and the Tianjin Synthetic Biotechnology Innovation Capacity Improvement Project (TSBICIP-PTJS-003).

\*Corresponding author. E-mail: Wangmeng@tib.cas.cn

Received: 2023-03-08; Accepted: 2023-05-30; Published online: 2023-06-20

研究为微生物流式分选建立了一套简单快捷的单细胞样品制备方法, 证实了PI染色法能够显著提高分选样品存活率。

关键词: 微生物; 流式分选; 存活率; 单细胞悬液

## Preparation of single cell suspension and survival rate improvement of microorganisms in fluorescence-activated cell sorting

WANG Lixian<sup>1</sup>, ZHANG Yue<sup>1</sup>, XIA Hairong<sup>2</sup>, TU Ran<sup>3</sup>, WANG Meng<sup>\*1</sup>

1 Key Laboratory of Engineering Biology for Low-carbon Manufacturing, Tianjin Institute of Industrial Biotechnology, Chinese Academy of Sciences, Tianjin 300308, China

2 Technical Support Center, Tianjin Institute of Industrial Biotechnology, Chinese Academy of Sciences, Tianjin 300308, China

3 College of Environmental and Resources, Chongqing Technology and Business University, Chongqing 400067, China

**Abstract:** **[Background]** High-throughput screening technologies represented by flow cytometry can efficiently screen the microbial strains with target characteristics. In fluorescence-activated cell sorting (FACS), the adhesion of microorganisms will lead to inaccuracy results and low purity. Therefore, a rapid and simple method for preparing single cell suspension is crucial for FACS to obtain reliable results. Desired mutants are usually screened out in fluorescence-based manners from the libraries generated by random mutagenesis with low positive mutation rates. However, the impurities and dead cells with strong spontaneous fluorescence tend to be included into the sorting gate, which will lead to false-positive results and reduce the survival rates of samples. It is urgent to improve the survival rate of microorganisms in FACS. **[Objective]** To establish a simple method for preparing single cell suspensions for FACS and improve the survival rate of sorted microorganisms. **[Methods]** *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Corynebacterium glutamicum*, and *Saccharomyces* were used as the samples. The morphological characteristics and cell adhesion degrees of the live microorganisms were observed by microscopy. Four treatments, including ultrasound, digestive enzyme, surfactant, and ultrasound-surfactant, were then employed to alleviate cell adhesion. To improve the survival rate of microorganisms in FACS, we treated *Saccharomyces cerevisiae* HZ848 expressing green fluorescent protein by atmospheric and room temperature plasma (ARTP) to generate a mutant library. The top 0.5% of the whole cells and the negative cells after propidium iodide (PI) staining were separately sorted based on their GFP intensities, and the single-cell survival rates under both conditions were calculated. **[Results]** Yeast cells were effectively monodispersed by the treatment of 0.01% Tween-80 combined with ultrasound for 1 min, where the single cell rate was over 88%, and the breakage rate of PI-stained cells was lower than 1.4%. The single cell dispersion of *C.*

*glutamicum* was achieved by the treatment with 0.01% Tween-80 combined with ultrasound for 5 min, where the single cell rate was over 97% and the breakage rate of PI-stained cells was lower than 1%. The survival rate of *S. cerevisiae* without PI staining was 4.3%, while this rate was raised to 18.3% for the PI-stained sample after removal of dead cells. **[Conclusion]** This study established a simple and rapid method to prepare single cell suspensions and provided a PI-staining strategy to significantly improve the survival rates of sorted samples in microbial FACS.

**Keywords:** microorganism; fluorescence-activated cell sorting; survival rate; single cell suspension

微生物及其产品广泛应用于工业、农业、医药等诸多领域,相关产业在国民经济中具有举足轻重的地位。自然界的微生物由于存在产量低、对工业生产条件耐受性不足,很少被直接用于工业生产<sup>[1]</sup>。近年来,人工智能、高效基因组编辑技术和合成生物学技术逐渐广泛使用,工业微生物领域的研究取得了快速进展<sup>[2]</sup>。研究人员通常采用随机或定向诱变的方法来提高工业微生物中目标产物的积累,由于有益突变的概率非常低,开发在大型突变库中快速筛选目标微生物细胞的方法变得尤为重要<sup>[1]</sup>。

分选型流式细胞仪是目前通量最高的筛选设备,流式细胞术(flow cytometry, FCM)是20世纪70年代发展起来的一项对细胞或其他微小生物颗粒快速定量分析的技术。它能同时对样品的多种物理和生物学参数进行定量检测,并可以实现对特定细胞群体进行快速分选<sup>[3]</sup>。流式细胞术主要应用于肿瘤学和免疫学研究<sup>[4]</sup>。当前流式细胞术在微生物研究领域的广泛应用主要面临着2个问题。(1)假阳性率高。微生物体积小、DNA和蛋白质等大分子含量通常比动物细胞低3个数量级<sup>[5]</sup>,这导致相关的测量信号常常处于传统流式细胞仪测量灵敏度的边界<sup>[6-7]</sup>;高产菌与原始菌在信号通道上差异不显著,原始菌通过粘连增加了信号强度,进而与高产菌一起进入分选区域被分选,造成筛选假阳性率

高。(2)存活率低。目前对于微生物的改造都是基于等离子诱变、易错PCR等建库方法,正突变率很低,一般筛选阳性率在0.5%以下<sup>[8-11]</sup>,阳性率低就增加了杂质、死细胞混入的比例,造成存活率低。因此,降低分选结果假阳性,提高分选存活率对工业微生物高通量筛选至关重要。

本文通过超声、消化酶消化、表面活性剂处理和超声-表面活性剂联合作用,探索和建立一种简便、对细胞损伤小、单细胞得率高的单细胞样品制备方法,用碘化丙啶(propidium iodide, PI)染色法追踪处理过程中的细胞损伤,并用PI染色法去除死细胞和杂质,提高分选后样品存活率。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株

研究所使用的大肠杆菌(*Escherichia coli*) BL21、DH5 $\alpha$ 、MG1655和W3110,枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) SCK6,谷氨酸棒状杆菌(*Corynebacterium glutamicum*) ATCC 13032,以及酿酒酵母菌(*Saccharomyces cerevisiae*) HZ848、HZ848-GFP均为本实验室保存菌株。毕赤酵母(*Pichia pastoris*) SMD1168H、GS115来源于本单位化学生物学研究中心,菌种保存于-80℃冰箱。所有菌株基因型如表1所示。

表 1 本文所用的菌株

Table 1 Strains used in this study

Strain	Genotype	Source
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	F <sup>-</sup> <i>ompT hsdSB</i> (rB <sup>-</sup> , mB <sup>-</sup> ) <i>gal dcm</i> (DE3)	Lab stock
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	F <sup>-</sup> , $\phi$ 80 <i>dlacZ</i> $\Delta$ M15, $\Delta$ ( <i>lacZYA-argF</i> )U169, <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> (rK <sup>-</sup> , mK <sup>+</sup> ), <i>phoA</i> , <i>supE44</i> , $\lambda^-$ , <i>thi-1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i>	Lab stock
<i>E. coli</i> K-12 MG1655	F <sup>-</sup> , $\lambda^-$ , <i>ilvG-rfb-50 rph-1</i>	Lab stock
<i>E. coli</i> W3110	F <sup>-</sup> , $\lambda^-$ , <i>mcrA mcrB IN(rrnD-rrnE)I</i>	Lab stock
<i>B. subtilis</i> SCK6	Erm <sup>R</sup> , 1A751 derivate, <i>lacA::PxylA-comK</i>	Lab stock
<i>C. glutamicum</i> ATCC 13032	Wild type	Lab stock
<i>S. cerevisiae</i> HZ848	<i>MATa</i> , <i>ade2-1</i> , $\Delta$ <i>ura3</i> , <i>his3-11, 15</i> , <i>trp1-1</i> , <i>leu2-3, 112</i> , <i>can1-100</i>	Lab stock
<i>S. cerevisiae</i> HZ848-GFP	<i>S. cerevisiae</i> HZ848 hosted with pRS414 plasmid, <i>gfp</i> is under the control of <i>GPM1</i> on the plasmid.	Lab stock
<i>P. pastoris</i> GS115	<i>his4</i>	Chemical Biology Research Center
<i>P. pastoris</i> SMD1168H	<i>pep4</i>	Chemical Biology Research Center

## 1.2 主要试剂和仪器

荧光微球, 贝克曼库尔特商贸(中国)有限公司; 溶壁酶, 西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司; 碘化丙啶染料、Tween-80、Triton X-100、蜗牛酶, 北京索莱宝科技有限公司。流式细胞分选仪(带孔板分选收集装置), 贝克曼库尔特商贸(中国)有限公司; 超声波清洗机, 宁波新芝生物科技股份有限公司; 荧光显微镜, 莱卡仪器有限公司; 等离子诱变仪, 无锡源清天木生物科技有限公司; 光吸收读板机, 美谷分子仪器(上海)有限公司。

## 1.3 培养基

LB 培养基(g/L): 胰蛋白胨 10.00, 酵母提取物 5.00, NaCl 10.00。

酵母浸出粉胨葡萄糖培养基(yeast extract peptone dextrose medium, YPD) (g/L): 酵母膏 10.00, 蛋白胨 20.00, 葡萄糖 20.00。

色氨酸缺陷型 SC 培养基(yeast synthetic drop-out medium without tryptophan, SC-Trp) (g/L): SC-Trp 补充剂 1.90, 酵母氮源基础 6.70, 葡萄糖 20.00, 腺嘌呤 0.05。

脑心浸液肉汤 (brain heart infusion-supplemented with LB, LBHIS)培养基(g/L): 蛋白胨 5.00, 酵母提取物 2.50, 氯化钠 5.00, 脑心浸液 18.50, 山梨醇 91.00。

固体培养基加入 18.00 g/L 琼脂粉。

## 1.4 方法

### 1.4.1 菌株准备

酿酒酵母菌(*S. cerevisiae*) HZ848、毕赤酵母(*P. pastoris*) SMD1168H、GS115 分别在 YPD 固体平板上划线接种, 30 °C 培养 48 h, 挑取平板上的单菌落至 5 mL YPD 液体培养基中, 30 °C、200 r/min 摇床培养过夜活化种子, 转接种子液至 OD<sub>600</sub> 为 0.2, 继续培养 6 h<sup>[12]</sup>。大肠杆菌(*E. coli*) BL21、DH5 $\alpha$ 、MG1655 和 W3110 和枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*) SCK6 在 LB 固体平板上划线接种, 37 °C 培养 16 h。挑取平板上的单菌落至 5 mL LB 液体培养基中, 37 °C、200 r/min 摇床培养过夜。谷氨酸棒状杆菌(*C. glutamicum*) ATCC 13032 在 LBHIS 固体平板上划线接种, 30 °C 培养 16 h。挑取平板上的单菌落至 5 mL LBHIS 液体培养基中, 30 °C、200 r/min 摇床培养过夜。

#### 1.4.2 显微镜观察

将大肠杆菌、谷氨酸棒状杆菌、枯草芽孢杆菌用磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffered saline, PBS)稀释至  $OD_{600}=1.7$ , 取 10  $\mu\text{L}$  制片, 用荧光显微镜 100 倍油镜观察。酵母稀释至  $OD_{600}=0.5$ , 取 10  $\mu\text{L}$  至血球计数板, 用荧光显微镜 40 倍物镜观察。

#### 1.4.3 流式分析

采用流式细胞仪进行分析, 选用 100  $\mu\text{m}$  喷嘴, 鞘液压力 30 PSI (pounds per square inch, 206.84 kPa), 将大肠杆菌、谷氨酸棒状杆菌和枯草芽孢杆菌用 PBS 稀释至  $OD_{600}=0.05$ , 酵母稀释至  $OD_{600}=0.5$ , 上机检测。用分析软件 Summit 5.2 分析, Forward scatter (FSC)是前向散射光, 表示样品相对大小; Side scatter (SSC)是侧向散射光, 表示样品内部复杂程度; Area 指电脉冲信号的面积, H 是电脉冲信号的高度, Log\_Height 是 H 参数的对数形式。用 FSC-A 和 SSC-Log\_Height 分析样品粘连情况, 用 FL1 (excitation/emission=488/515–543 nm)通道分析 GFP 荧光信号强度, 用 FL3 (excitation/emission=488/605–635 nm)通道分析 PI 的染色情况。

#### 1.4.4 微生物的粘连对流式检测的影响

将培养好的毕赤酵母 SMD1168H 分成两等份, 一份经过单细胞处理后进行流式分析, 在 GFP 通道上以此样品为阴性对照样品圈出阳性区域; 另一份直接流式分析检测 GFP 通道信号。

#### 1.4.5 分散处理

将酵母菌用 PBS 稀释至  $OD_{600}=0.5$ , 超声波清洗机参数设定为频率 40 kHz, 功率 120 W, 分别超声 0、1、3、5 和 10 min, 每个样品设置 3 个重复。

消化酶: 将蜗牛酶、溶壁酶按照终浓度 0.01%、0.1%和 1%加入酵母溶液中, 32  $^{\circ}\text{C}$ 消化 1 h。

表面活性剂: 将 Tween-80 和 Triton X-100 按照终浓度 0.01%、0.05%和 0.10%加入酵母溶

液中混匀, 室温放置 10 min。

超声与表面活性剂联合处理: 0.01% Tween-80 与超声 1 min 联合, 对酵母细胞进行分散处理。0.01% Tween-80 与超声 1、3 和 5 min 联合, 对谷氨酸棒状杆菌进行分散处理。

#### 1.4.6 PI 染色

将 PI 以终浓度 3.4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  加入处理好的待测样品中, 室温避光染色 10 min。

#### 1.4.7 流式分选

按照流式细胞仪孔板收集装置使用程序调整孔板的位置, 并建立单细胞分选程序。为了防止污染, 分选样品前用 1%次氯酸钠进样 5 min, 再使用无菌水上样 5 min, 确保机器处于无菌环境且无次氯酸钠溶液残留。

#### 1.4.8 常压室温等离子诱变

将菌株 HZ848-GFP 接种于 SC-Trp 固体培养基上, 30  $^{\circ}\text{C}$ 条件下培养 2 d。挑取单菌落于 SC-Trp 液体培养基中, 30  $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 培养 16 h。用无菌 PBS 将酿酒酵母 HZ848-GFP 制备成菌悬液( $1 \times 10^7$  CFU/mL)进行等离子体诱变, 功率 120 W, 氦气流量 10 SLM; 取 10  $\mu\text{L}$  菌悬液涂匀至照射铁片上, 文献[13]表明酿酒酵母在等离子诱变 30 s 时间的致死率是 90%, 能达到良好的突变率, 所以选择诱变时间 30 s, 加 200  $\mu\text{L}$  的 SC-Trp 液体培养基, 30  $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 条件下培养 7 h。PI 染色 10 min 后进行流式分析与分选。

## 2 结果与分析

### 2.1 微生物的粘连对流式检测的影响

微生物聚集粘连对流式分选最主要的表现是分选强荧光的区域, 验证无强荧光表达。原因可能是阴性菌体聚集增加了荧光值。将毕赤酵母 SMD1168H 分成两等份, 一份经过单细胞处理后显微镜观察并用流式检测, 在 GFP 通道上以此样品为阴性对照样品圈出阳性区域。另一份直

接显微镜观察,并用流式分析检测 GFP 通道信号。结果如图 1 所示,经过单细胞分散处理的样品流式分析结果比较均一,99%都集中在阳性分选门之外,而未经过分散处理的样品,流式分析结果弥散,有 31.75%的样品表现为 GFP 阳性。同样一份样品,如果粘连就会产生假阳性信号,干扰分选的准确性。

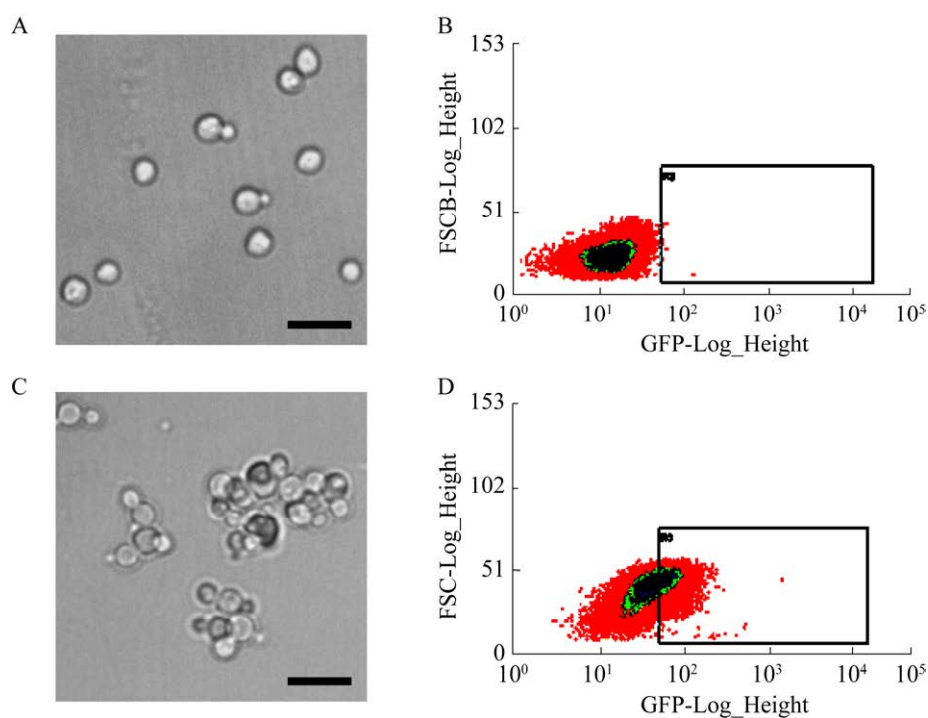
## 2.2 形态学显微镜观察

微生物由于宿主不同、培养条件不一、细胞壁成分差异等因素,造成结构形态有很大差别。为了验证哪些菌存在粘连情况,将微生物样品进行显微镜观察。如图 2 所示,大肠杆菌 BL21(DE3)、DH5 $\alpha$ 、MG1655 和 W3110 为单细

胞;枯草芽孢杆菌 SCK6 长短不一,两端常有深色芽孢;谷氨酸棒状杆菌 ATCC 13032 粘连严重。酿酒酵母 HZ848 多为单细胞,不分裂的二细胞,毕赤酵母 GS115 和 SMD1168H 粘连严重。选取 HZ848 作为对照,与 GS115 和 SMD1168H 一起进行单细胞分散条件优化。

## 2.3 微生物单细胞分散条件优化

流式分析和分选的基础就是单细胞悬液<sup>[14]</sup>,流式细胞仪本身不具备单细胞分散功能。动物组织、贴壁培养细胞、植物细胞等都需要添加消化酶制备单细胞,制备过程需严格控制,避免细胞结团死亡。样品粘连容易造成分析结果不准确,分选结果为假阳性和杂合体。聚集粘连的微生物



**图 1** 微生物粘连对流式检测的影响 A: 经过单细胞化处理样品的显微成像图. B: 经过单细胞化处理样品的流式分析结果. C: 未经过单细胞化处理样品的显微成像图. D: 未经过单细胞化处理样品的流式分析结果. 流式图横轴代表 GFP 荧光强度, 纵轴代表细胞相对大小. 标尺: 10  $\mu\text{m}$

Figure 1 Effects of microbial adhesion on FCM analysis. A: The microscopic image of the sample after unicellular treatment. B: The FCM analysis of the samples after unicellular treatment. C: Microscopic image of the sample without unicellular treatment. D: The FCM analysis of the samples without unicellular treatment. The horizontal axis of the FCM analysis represents the fluorescence intensity of GFP, while the vertical axis represents the relative size of cells. Scale bar: 10  $\mu\text{m}$ .

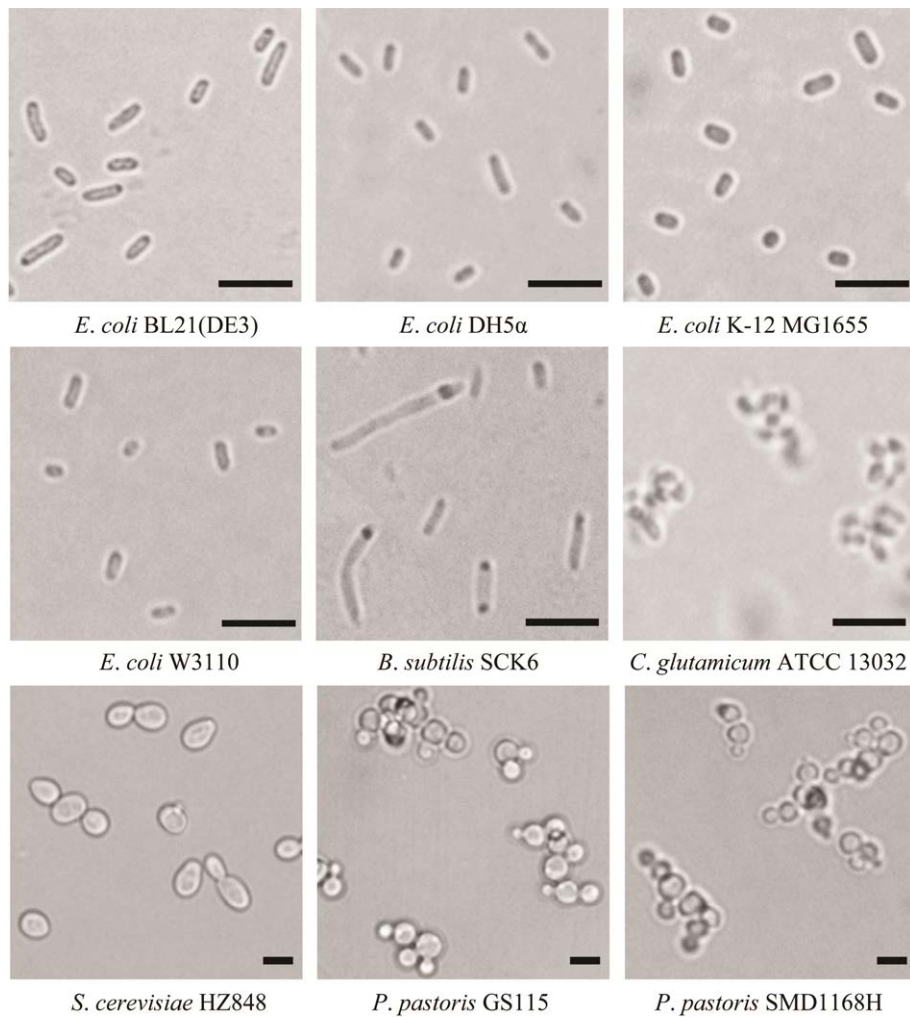


图 2 微生物形态学显微镜观察

Figure 2 Microscopic observation of microorganism samples. Scale bar: 5  $\mu\text{m}$ .

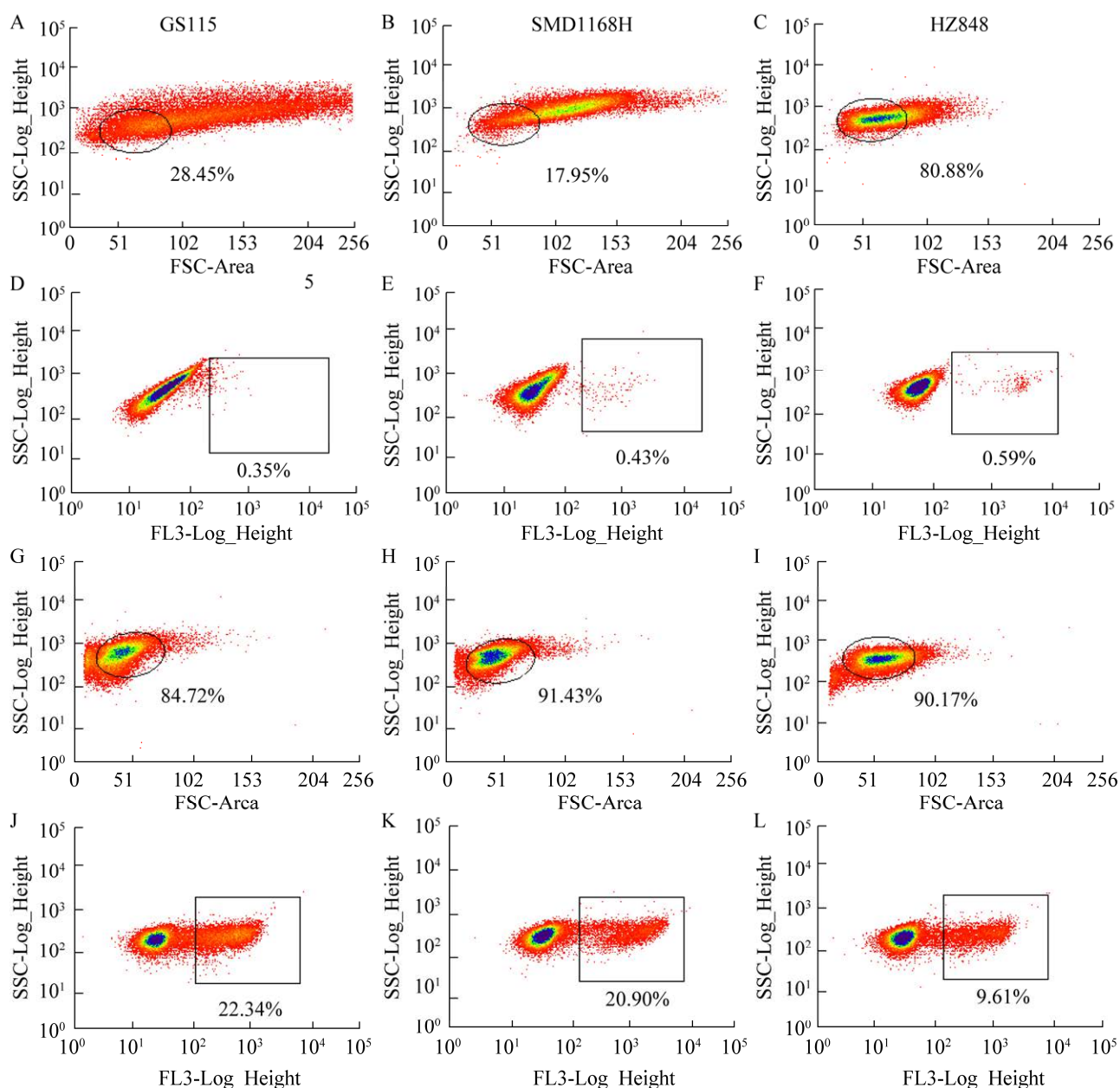
样品,也需要特殊的单细胞处理方法,单细胞样品制备过程容易对细胞产生一定的损伤,PI染料可以透过损伤的细胞膜,用来标记死细胞。

### 2.3.1 超声对单细胞分散效果的影响

超声清洗的原理是超声波在液体中传播产生的大量气泡和爆破分解污垢而达到清洗目的。超声清洗可以用于粘连细胞的分散,在微流控筛选酿酒酵母进行样品制备时,需进行3次10 s超声波处理(40 W)以避免细胞黏附<sup>[15-16]</sup>。然而对于粘连非常严重的毕赤酵母,这个条件显然不够。对GS115、SMD1168H和HZ848这3种酵母进行不同时间的超声处理,用流式细胞仪和显

微镜来检测分散效果,结果如图3-图5所示。流式分析中用FSC-SSC表示样品大小均一性,圈选超声处理后比较集中的细胞群为单细胞区域,分别统计超声前后此区域的比例,定义为单细胞率。定义PI染色阳性区域为破损细胞。

图3结果表明,超声10 min能够显著提高单细胞比例,但细胞破损率明显升高。GS115单细胞率从28.45%升高到84.72%,破损率从0.35%升高到22.34%;SMD1168H单细胞率从17.95%升高到91.43%,破损率从0.43%升高到20.90%;HZ848单细胞率从80.88%升高到90.17%,破损率从0.59%升高到9.61%。



**图 3** 酵母细胞超声前后流式分析 A、B、C 分别是 GS115、SMD1168H、HZ848 超声前 FSC-SSC 流式分析图。D、E、F 分别是 GS115、SMD1168H、HZ848 超声前 PI 染色流式分析图。G、H、I 分别是 GS115、SMD1168H、HZ848 超声 10 min 后 FSC-SSC 流式分析图。J、K、L 分别是 GS115、SMD1168H、HZ848 超声 10 min 后 PI 染色流式分析图。FSC-Area 代表细胞相对大小，SSC-Log\_Height 代表细胞内部复杂度，FL3-Log\_Height 代表 PI 染色强度

Figure 3 FCM analysis of yeast cells before and after ultrasound. A, B and C are the FSC-SSC analysis of GS115, SMD1168H and HZ848 before ultrasound. D, E and F are the PI analysis of GS115, SMD1168H and HZ848 before ultrasound. G, H and I are the FSC-SSC analysis of GS115, SMD1168H and HZ848 after ultrasound for 10 min. J, K and L are the PI analysis of GS115, SMD1168H and HZ848 after ultrasound for 10 min. FSC-Area represents relative size of cells, SSC-Log\_Height represents the internal complexity of cells, FL3 Log\_Height represents PI intensity. Scale bar: 10  $\mu$ m.



由于超声 10 min 细胞破损率较高, 分别将超声 0、1、3、5 和 10 min 的单细胞率和 PI 阳性率进行了统计学分析。如图 4 所示, 随着超声时间的延长, 单细胞率逐渐上升, PI 染色阳性率逐渐升高。在超声 3 min 时, GS115 PI 阳性率为 6.14%, 单细胞率为 56.9%; SMD1168H PI 阳性率为 12.76%, 单细胞率为 44.62%。即在细胞损伤较大的情况下, 细胞分散效果并不理想。SMD1168H PI 阳性率呈现先上升后下降的趋

势, 推测超声时间过长使细胞完全破损, 细胞核流出而不能被 PI 染色。

为了进一步证实超声对酵母细胞的损伤, 选取不同超声时间的酵母细胞进行了显微镜观察。如图 5 所示, 随着超声时间延长, 3 种酵母都出现了无细胞核的破裂细胞(如图 5 黄色箭头所示)。因此, 超声能够使粘连的酵母细胞分散成单细胞, 但是超声对样品的损伤较大。超声时间大于 3 min 时 3 种酵母出现不同比例的破裂细胞。

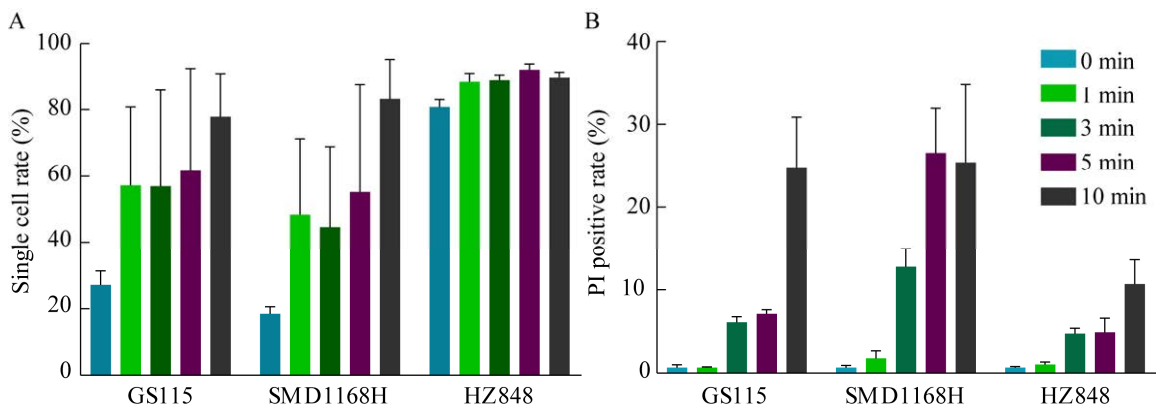


图 4 超声处理后酵母细胞流式分析的数据统计 A: 超声 0、1、3、5 和 10 min 单细胞率的统计. B: 超声 0、1、3、5 和 10 min 破损率的统计

Figure 4 The statistics of the yeast cells' FCM analysis after ultrasound treatment. A: The statistics of the single cell rate after ultrasound for 0, 1, 3, 5, and 10 min. B: The statistics of the PI positive rate after ultrasound for 0, 1, 3, 5, and 10 min.

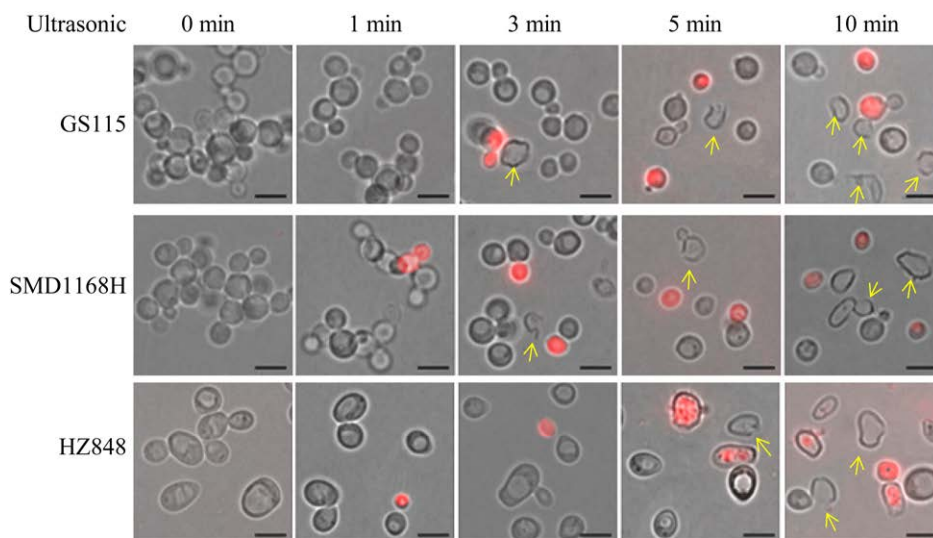


图 5 酵母细胞超声后荧光显微镜观察

Figure 5 Fluorescence microscope observation of yeast cells after ultrasound. Scale bar: 5  $\mu$ m.

### 2.3.2 消化酶浓度对酵母单细胞分散条件的影响

常用的细胞壁降解酶有溶壁酶、纤维素酶和蜗牛酶等<sup>[17]</sup>。真菌制备原生质体通常采用酶解法去除细胞壁。酵母细胞壁组成主要有蛋白质、甘露聚糖、 $\beta$ -葡聚糖、糖蛋白和几丁质。细胞粘连主要是细胞壁的成分造成的,降解细胞壁的过程有可能会使细胞分散。本研究探讨了溶壁酶和蜗牛酶两种消化酶的不同浓度对酵母细胞的分散作用,如图 6 所示,不同浓度消化酶处理后,PI 阳性率均小于 2.1%,对细胞的损伤小,但是单细胞得率较低,GS115 单细胞率能达到 77.6%,SMD1168H 单细胞率能达到 72.89%,推

测延长消化时长能够进一步提高单细胞率,但是不利于快速制样。

### 2.3.3 表面活性剂浓度对酵母单细胞分散的影响

表面活性剂分为三类:离子型、两性离子型和非离子型。非离子型表面活性剂不破坏蛋白的结构,作用温和,如 Tween-80 和 Triton X-100,它们不是细胞裂解液的常见组分,但是通常见于免疫印迹和酶联免疫吸附试验中的洗涤缓冲液,有文献表明在溶解真菌孢子中加入 0.05% Tween-80 能有效防止粘连<sup>[18]</sup>。本研究探讨了 Triton X-100 和 Tween-80 两种表面活性剂的不同浓度对酵母细胞的分散作用。结果如图 7 所示,2 种表面活

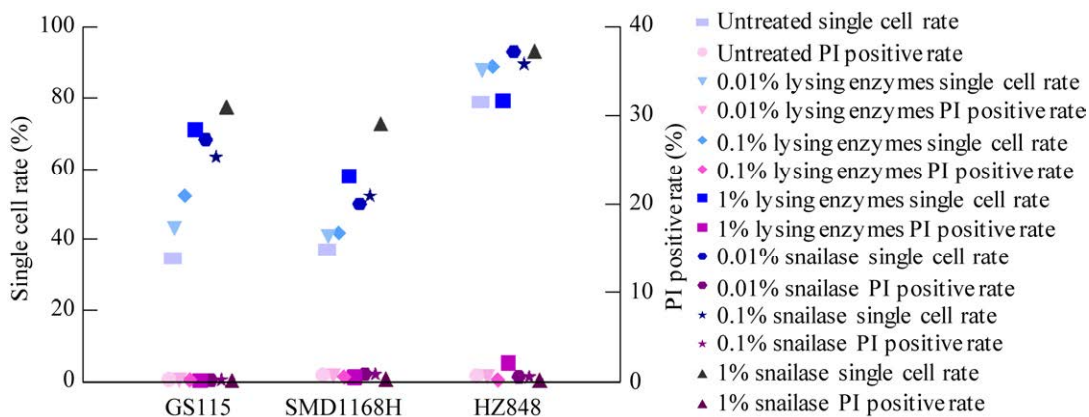


图 6 消化酶处理对酵母细胞分散及活性的影响

Figure 6 Effects of digestive enzyme treatment on yeast cell dispersion and activity.

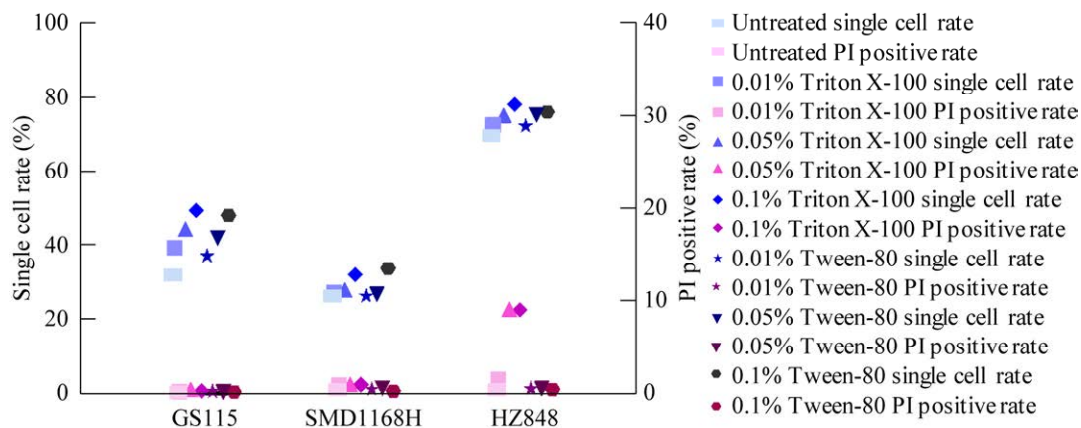


图 7 表面活性剂处理对酵母细胞分散及活性的影响

Figure 7 Effects of surfactant treatment on yeast cell dispersion and activity.

性剂单独作用对细胞的分散作用效果不明显, Triton X-100 对细胞损伤大, 0.05%的 Triton X-100 对 HZ848 处理的 PI 阳性率 >9%, Tween-80 对细胞损伤小, 0.1%的 Tween-80 对 3 种酵母细胞的 PI 阳性率 <0.5%。

### 2.3.4 超声与 Tween-80 联合作用对酵母单细胞分散的影响

由于超声时间长容易造成细胞破裂, 所以选取超声 1 min 这个条件进行联合优化。消化酶处理需要 32 °C 温育 1 h, 不利于快速制样, Tween-80 对细胞损伤小, 所以用超声联合 Tween-80 对细胞进行分散处理。结果如图 8 所示, 超声 1 min 与 0.01% Tween-80 联合作用对 3 种酵母细胞的分散作用都达到 88%以上, PI 阳性率均 <1.4%。

### 2.3.5 超声与 Tween-80 联合作用对谷氨酸棒状杆菌 ATCC 13032 的分散作用

通过图 2 微生物显微镜观察发现, 除了酵母菌, 谷氨酸棒状杆菌 ATCC 13032 也存在严重的粘连, 采用同样的方法进行了分散处理, 如图 9 所示。谷氨酸棒状杆菌 ATCC 13032 用 0.01% Tween-80 联合超声 1 min 的分散方法, 单细胞率

不足 70%, PI 阳性率为 0.68%, 因此增加超声时间为 3 min 和 5 min。最终确定谷氨酸棒状杆菌 ATCC 13032 单细胞分散条件为 0.01% Tween-80 联合超声 5 min, 单细胞率 97.9%, PI 阳性率为 0.8%。结果如图 9、10 所示。

### 2.4 通过 PI 染色去除死细胞对分选存活率的影响

等离子诱变、易错 PCR 片段转染等建库方法都将造成大量死细胞, 一般传统做法是涂布固体平板, 长出单菌落后再刮板进行液体培养后筛选。酵母涂平板长出单菌落一般需要 36–48 h, 这种方法不仅费时费力, 而且可能由于传代次数太多造成正突变的比例下降。本文推荐建库后直接液体混合培养, 用 PI 染色法去除死细胞, 不仅省时省力, 还能尽可能保持突变库的原始状态。将含有 GFP 的酿酒酵母 HZ848 用等离子诱变后, 分选全细胞 GFP 信号强度前 0.5%和 PI 阴性 GFP 前 0.5%。结果如图 11 所示, 直接分选全细胞 GFP 前 0.5%的存活率是 4.3%, 分选 PI 阴性 GFP 前 0.5%的存活率是 18.3%, PI 染色法的存活率是未染色的 4.3 倍, PI 染色能够显著提高微生物的分选存活率。

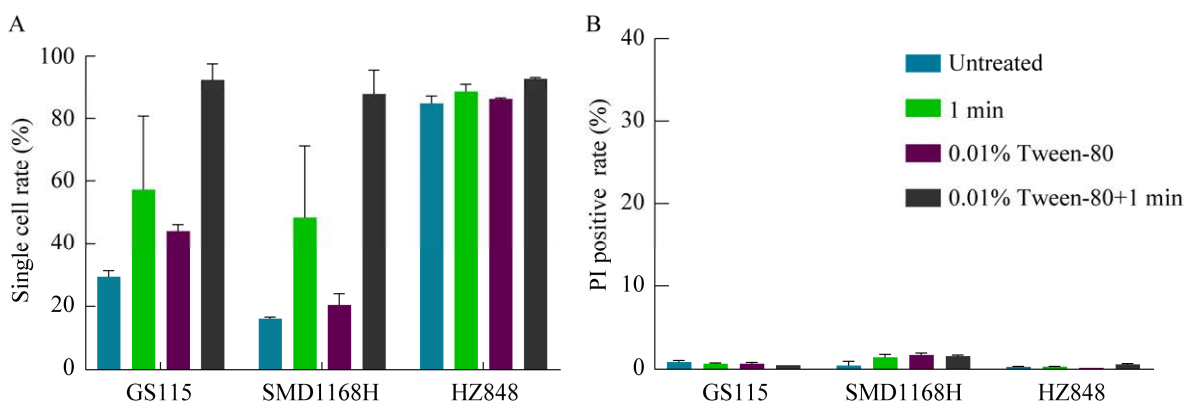


图 8 联合作用对酵母单细胞分散的影响 A: 未处理, 超声 1 min、0.01% Tween-80 和联合作用单细胞率统计图. B: 未处理, 超声 1 min、0.01% Tween-80 和联合作用细胞破损率统计图

Figure 8 Effects of the combination on yeast single-cell dispersion. A: The single cell rate of the untreated, ultrasound for 1 minute, 0.01% Tween-80 and combination treatment. B: The damage rate of untreated, ultrasound for 1 minute, 0.01% Tween-80 and combination treatment.

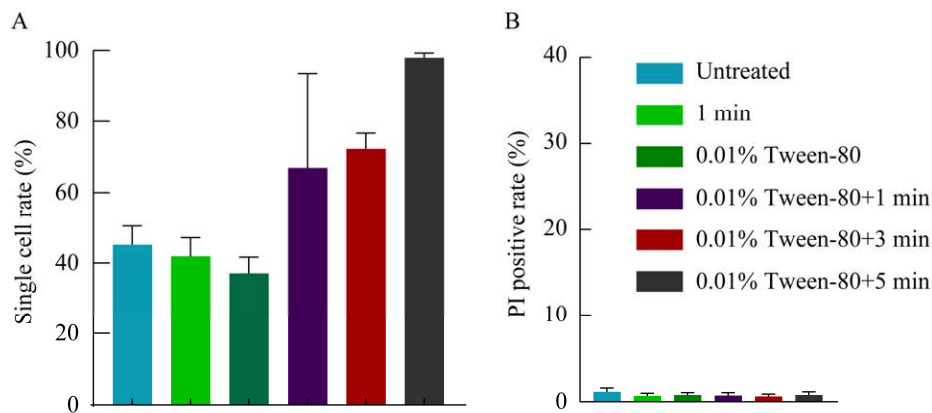


图9 单分散处理后谷氨酸棒状杆菌流式分析的数据统计 A: 不同处理组单细胞率. B: 不同处理组细胞破损率

Figure 9 The statistics of FCM analysis of *Corynebacterium glutamicum* after single-cell treatment. A: Single cell rate in different treatment groups. B: Cell damage rate in different treatment groups.

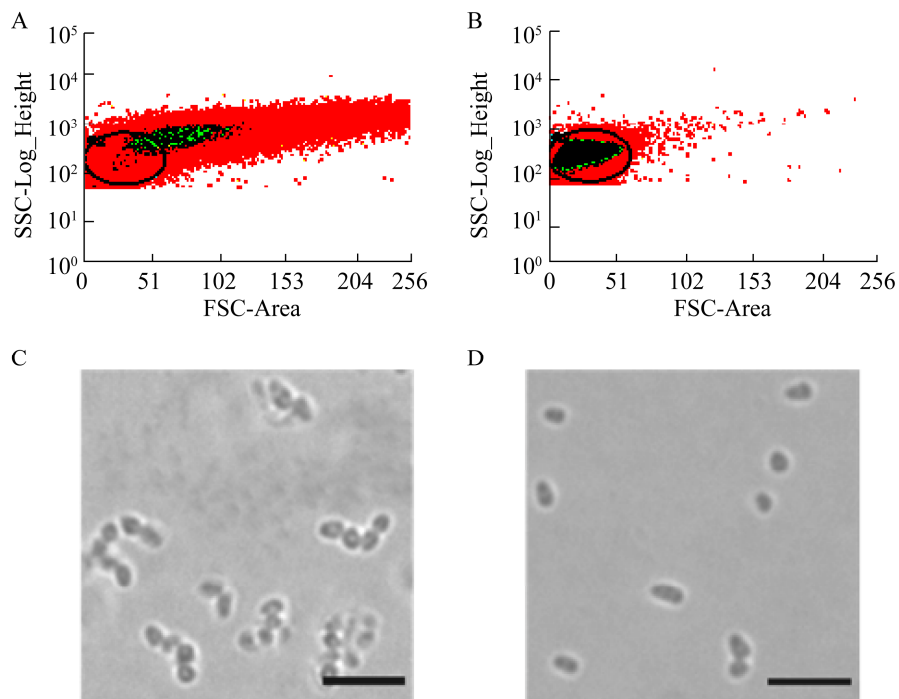


图10 联合作用对谷氨酸棒状杆菌单细胞分散的影响 A: 未处理组 FSC-SSC 流式图. B: 0.01% Tween-80 联合超声 5 min 处理组 FSC-SSC 流式图. C: 未处理组显微镜成像图. D: 0.01% Tween-80 联合超声 5 min 处理组显微镜成像图. 标尺: 5  $\mu$ m

Figure 10 Effects of the treatment by ultrasound combined with Tween-80 on *Corynebacterium glutamicum* single-cell dispersion. A: The FSC-SSC image of untreated group. B: The FSC-SSC image of the treated group (0.01% Tween-80 combined with ultrasound for 5 min). C: The microscopic image of the untreated group. D: The microscopic image of the treated group (0.01% Tween-80 combined with ultrasound for 5 min). Scale bar: 5  $\mu$ m.

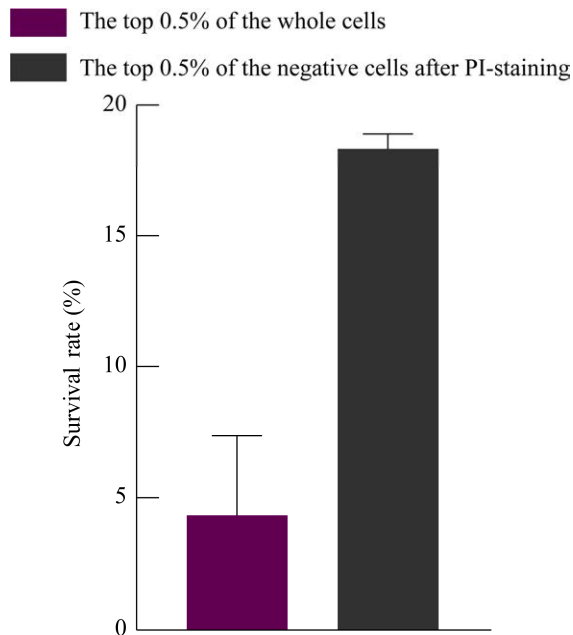


图 11 PI 染色前后样品的 FACS 分选存活率  
Figure 11 Survival rates of the samples with and without PI staining in FACS.

### 3 讨论与结论

在基于荧光信号的流式分选试验中,测试菌体的粘连会导致荧光值增加,从而进入分选区域而造成假阳性。因此,测试样品的单细胞化是成功进行流式分析及分选的前提条件。一般来讲,通过缩短微生物培养时间和降低测试样品浓度可以在一定程度上降低粘连率。例如,大肠杆菌 BL21 高浓度时存在粘连,而在低浓度时基本为单细胞,因此 BL21 可以通过 PBS 稀释法来制备单细胞悬液。但在基于荧光信号的定向进化混库筛选等应用实例中,荧光蛋白的表达需要一定的时间,在使用诱导型元件时还需要在培养中途添加诱导剂,这些因素导致微生物的培养时间不能被任意缩短。然而无限稀释会降低上样速度,导致流式分析分选时间延长,降低了试验效率。因此建立一种简便易行、不改变整体试验设计的样品制备方法尤为重要。本研究建立了一种微生物流式分选的单细胞样品制备方法,通过比较多种

样品单细胞化条件,最终确定了超声联合 Tween-80 处理样品时单细胞化最为理想,且能最大程度保证细胞的存活率。0.01% Tween-80 与超声 1 min 联合对酵母细胞的单细胞率>88%,PI 染色阳性率<1.4%。0.01% Tween-80 与超声 5 min 联合对谷氨酸棒状杆菌 ATCC 13032 的单细胞率>97%,PI 染色阳性率<1%。

除了物理的单细胞样品制备方法,通过流式分析圈门的方法也可以在一定程度上去除粘连,获得单细胞的数据,如通过 FSC-H 和 FSC-A 对角线原则去除粘连<sup>[19]</sup>。然而有些粘连严重的微生物样品单细胞比例很低或几乎无单细胞,就无法通过简单圈门获得单细胞,因此对于粘连严重的样品仍需要进行单细胞处理以提高单细胞样品量和分选纯度。

本文结果中流式分析和显微镜观察的单细胞率趋势一致,但是具体数值不相等,流式鞘液的流体剪切力作用有可能也起到促进细胞单分散作用。因此流式数据只能提供前处理带来的单细胞率提升或下降的趋势,无法作为定量依据。微流控芯片通过油相对水相的剪切进行液滴生成,有可能被开发出来实现更好的单细胞分散,并有可能通过芯片上的流体、声学 and 电学等功能区域实现多细胞团的去除。

造成分选结果假阳性的原因除了菌体粘连还有样品的大小不均。即使是实验室中培养的单克隆群体,细胞之间也可能在遗传、生理、生化和行为等方面表现出广泛的差异性,这种现象被称为微生物异质性,它是自然界中的微生物群体在多变环境中生存的一种策略<sup>[20-21]</sup>。异质性容易造成形态改变,如长短不一的菌丝,可以说是另一种“粘连”。不同微生物菌种的菌体大小均一性不同,如图 2 和图 10D 所示,枯草芽孢杆菌 SCK6 菌体长短差异最大,大肠杆菌 BL21、DH5 $\alpha$  和 W3110 次之,大肠杆菌 MG1655 和谷氨酸棒状

杆菌 ATCC 13032 的单细胞大小较为均匀。

传统的突变体库筛选方式是建库完成后涂布固体平板, 然后挑取单克隆进行孔板验证。这种方法能够保证存活率但耗时较长, 酵母涂平板长出单菌落一般需要 36–48 h, 外源表达质粒会对宿主菌生长造成一定的负担<sup>[22]</sup>, 多次传代将导致正突变的比例下降。本文建立了一种方法, 建库后直接液体混合培养, 用 PI 染色法去除死细胞, 不仅省时省力, 还能尽可能保持突变库的原始状态。我们将含有 GFP 表达菌 HZ848 进行等离子诱变后, 分别从全细胞样品和 PI 染色阴性样品中分选 GFP 通道的前 0.5%。结果表明直接分选全细胞的存活率是 4.3%, 而分选 PI 染色阴性样品的存活率是 18.3%, 即经 PI 染色后再分选, 存活率提升至原来的 4.3 倍, 由此可见 PI 染色方法能够显著提高微生物突变体库的分选存活率。

进行基于荧光信号的分选时, 假阳性信号的干扰是分选后存活率低的主要原因, 而荧光假阳性信号主要有 3 种来源: 样品中自发荧光的死细胞、粘连后增加荧光值的阴性样品和经过分选后致死的正常细胞<sup>[23]</sup>。在利用流式高通量筛选微生物阳性突变体的应用中, 阳性率一般都低于 0.5%<sup>[8–11]</sup>, 分选比例低容易造成死细胞混入的比例升高, 降低分选存活率。PI 是一种大分子物质, 它不能通过完整活细胞膜且在活细胞表面的荧光残留最低, 低浓度 PI (5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 对细胞活性几乎无影响<sup>[24–25]</sup>, 可以解决由于死细胞混入造成阳性率低的问题。此外, PI 染料还有价格便宜、染色速度快、可即用即染的优势。已证实流式细胞仪会对分选后的细胞造成损伤, 如包裹微生物的液滴高速喷出造成的机械损伤, 偏转电极产生的电荷对细胞活性的影响, 以及液滴在高速撞击液体培养基表面冲击力造成的细胞破裂等, 都会导致分选后的单细胞失活<sup>[26]</sup>。对于在 FACS 试验

中致死率较高的微生物, 可以通过更换培养条件、优化分选参数(如降低鞘液压力和降低分选电压)、更换相似但存活率更高的菌种等方法提高分选成功率。

总之, 本研究探索并建立微生物流式分选的单细胞样品制备方法, 用 PI 染色能够提高流式分选单细胞存活率, 并分析了可能影响微生物分选纯度和存活率的因素, 为基于流式细胞术的微生物高通量筛选提供技术指导。

## REFERENCES

- [1] ZENG WZ, GUO LK, XU S, CHEN J, ZHOU JW. High-throughput screening technology in industrial biotechnology[J]. *Trends in Biotechnology*, 2020, 38(8): 888-906.
- [2] 邓禹, 赵心清. 工业微生物: 创新与突破专刊序言(2021)[J]. *生物工程学报*, 2021, 37(3): 801-805.  
DENG Y, ZHAO XQ. Preface for special issue on industrial microorganisms: innovation and breakthrough(2021)[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2021, 37(3): 801-805 (in Chinese).
- [3] BANG H, CHUNG C, KIM JK, KIM SH, CHUNG S, PARK J, LEE WG, YUN H, LEE J, CHO K, HAN DC, CHANG JK. Microfabricated fluorescence-activated cell sorter through hydrodynamic flow manipulation[J]. *Microsystem Technologies*, 2006, 12(8): 746-753.
- [4] 刘贵建, 王卉. 流式细胞术在造血和淋巴组织肿瘤诊疗中应用的思考[J]. *中华检验医学杂志*, 2021, 44(12): 1097-1100.  
LIU GJ, WANG H. Thinking of flow cytometry in the diagnosis and treatment of tumors of hematopoietic and lymphoid tissues(2021)[J]. *Chinese Journal of Laboratory Medicine*, 2021, 44(12): 1097-1100 (in Chinese).
- [5] VIVES-REGO J, LEBARON, P, NEBE-VON CARON G. Current and future applications of flow cytometry in aquatic microbiology[J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2000, 24(4): 429-448.
- [6] NEBE-VON-CARON G. Standardization in microbial cytometry[J]. *Cytometry Part A: the Journal of the International Society for Analytical Cytology*, 2009, 75(2): 86-89.

- [7] VEAL DA, DEERE D, FERRARI B, PIPER J, ATTFIELD PV. Fluorescence staining and flow cytometry for monitoring microbial cells[J]. *Journal of Immunological Methods*, 2000, 243(1/2): 191-210.
- [8] LIU YN, LI QG, ZHENG P, ZHANG ZD, LIU YF, SUN CM, CAO GQ, ZHOU WJ, WANG XW, ZHANG DW, ZHANG TC, SUN JB, MA YH. Developing a high-throughput screening method for threonine overproduction based on an artificial promoter[J]. *Microbial Cell Factories*, 2015, 14: 121.
- [9] CAI YY, XIA MM, DONG HN, QIAN Y, ZHANG TC, ZHU BW, WU JC, ZHANG DW. Engineering a vitamin B<sub>12</sub> high-throughput screening system by riboswitch sensor in *Sinorhizobium meliloti*[J]. *BMC Biotechnology*, 2018, 18(1): 1-11.
- [10] XU LP, LIU PP, DAI ZB, FAN FY, ZHANG XL. Fine-tuning the expression of pathway gene in yeast using a regulatory library formed by fusing a synthetic minimal promoter with different Kozak variants[J]. *Microbial Cell Factories*, 2021, 20(1): 1-11.
- [11] DING DQ, LI JL, BAI DY, FANG H, LIN JP, ZHANG DW. Biosensor-based monitoring of the central metabolic pathway metabolites[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2020, 167: 112456.
- [12] STARK MJR. The awesome power of yeast genetics-practical approaches and recipes for success[J]. *Journal of Cell Science*, 2001, 114(14): 2551-2552.
- [13] 赵苗苗, 赵智慧, 董建方, 马艳, 陆健, 吴殿辉. 枸杞酒酿酒酵母的选育及其产香性能分析[J]. *食品与发酵工业*, 2022, 48(18): 155-161.
- ZHAO MM, ZHAO ZH, DONG JF, MA Y, LU J, WU DH. Selection and breeding of *Saccharomyces cerevisiae* for wolfberry wine and analysis of its flavor-producing properties[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2022, 48(18): 155-161 (in Chinese).
- [14] 陈琳, 李晶晶, 周波. 小鼠造血干细胞的流式分析[J]. *中国细胞生物学学报*, 2021, 43(11): 2169-2176.
- CHEN L, LI JJ, ZHOU B. Flow cytometric analysis of mouse hematopoietic stem cells[J]. *Chinese Journal of Cell Biology*, 2021, 43(11): 2169-2176 (in Chinese).
- [15] HUANG MT, BAI YP, SJOSTROM SL, HALLSTRÖM BM, LIU ZH, PETRANOVIC D, UHLÉN M, JOENSSON HN, ANDERSSON-SVAHN H, NIELSEN J. Microfluidic screening and whole-genome sequencing identifies mutations associated with improved protein secretion by yeast[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2015, 112(34): E4689-E4696.
- [16] SJOSTROM SL, BAI YP, HUANG MT, LIU ZH, NIELSEN J, JOENSSON HN, ANDERSSON SVAHN H. High-throughput screening for industrial enzyme production hosts by droplet microfluidics[J]. *Lab on a Chip*, 2014, 14(4): 806-813.
- [17] 沈慧敏, 李超, 高利, 刘太国, 刘博, 陈万权. 原生质体法介导真菌遗传转化的研究进展[J]. *植物保护*, 2017, 43(2): 25-28, 42.
- SHEN HM, LI C, GAO L, LIU TG, LIU B, CHEN WQ. Research progress in transformation of fungi mediated by protoplasts[J]. *Plant Protection*, 2017, 43(2): 25-28, 42 (in Chinese).
- [18] KWON MJ, JØRGENSEN TR, NITSCHKE BM, ARENTSHORST M, PARK J, RAM AFJ, MEYER V. The transcriptomic fingerprint of glucoamylase over-expression in *Aspergillus niger*[J]. *BMC Genomics*, 2012, 13: 701.
- [19] 谢小梅, 许杨. 流式细胞术[J]. *中国生物工程杂志*, 2003, 23(9): 100-104.
- XIE XM, XU Y. Flow cytometry in biotechnology[J]. *China biotechnology*, 2003, 23(9): 100-104 (in Chinese).
- [20] CHOO-SMITH LP, MAQUELIN K, VAN VREESWIJK T, BRUINING HA, PUPPELS GJ, THI NAN, KIRSCHNER C, NAUMANN D, AMI D, VILLA AM, ORSINI F, DOGLIA SM, LAMFARRAJ H, SOCKALINGUM GD, MANFAIT M, ALLOUCH P, ENDTZ HP. Investigating microbial (micro)colony heterogeneity by vibrational spectroscopy[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 67(4): 1461-1469.
- [21] DAVEY HM, KELL DB. Flow cytometry and cell sorting of heterogeneous microbial populations: the importance of single-cell analyses[J]. *Microbiological Reviews*, 1996, 60(4): 641-696.
- [22] KARIM AS, CURRAN KA, ALPER HS. Characterization of plasmid burden and copy number in *Saccharomyces cerevisiae* for optimization of metabolic engineering applications[J]. *FEMS Yeast Research*, 2013, 13(1): 107-116.
- [23] 辛忠涛. 流式细胞分选技术在微生物表面展示文库筛选中的应用进展[J]. *微生物学免疫学进展*, 2003, 31(3): 62-66.

- XIN ZT. Applications of flow cytometry sorting in microbial surface display libraries[J]. *Progress in Microbiology and Immunology*, 2003, 31(3): 62-66 (in Chinese).
- [24] 庄丽伟, 许厚强, 隋世燕, 王海娜, 张勇, 陈祥, 主性. 荧光双色法快速评价小鼠桑椹胚活力[J]. *四川动物*, 2009, 28(2): 72-74.
- ZHUANG LW, XU HQ, SUI SY, WANG HN, ZHANG Y, CHEN X, ZHU X. Rapid determination of mouse morula viability by simultaneous staining with fluorescein diacetate-propidium iodide[J]. *Sichuan Journal of Zoology*, 2009, 28(2): 72-74 (in Chinese).
- [25] LAU AC, CUI H, TYMIANSKI M. The use of propidium iodide to assess excitotoxic neuronal death in primary mixed cortical cultures[M]//*Methods in Molecular Biology*. Totowa, NJ: Humana Press, 2007: 15-29.
- [26] 阮楚晋, 郑小伟, 王丽, 王铎, 朱雅新, 王剑, 贡娟莉, 董志扬, 陆祖军, 黄英, 杜文斌, 黄力, 戴欣. 基于流式细胞仪高通量分选的深海微生物单细胞培养[J]. *微生物学报*, 2021, 61(4): 816-827.
- RUAN CJ, ZHENG XW, WANG L, WANG Y, ZHU YX, WANG J, YUN JL, DONG ZY, LU ZJ, HUANG Y, DU WB, HUANG L, DAI X. Isolation of deep-sea microorganisms by flow cytometry-based high-throughput cell sorting and single cell cultivation[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2021, 61(4): 816-827 (in Chinese).