

流式细胞术揭示出枯草芽孢杆菌多态异质性*

刘春春^{1, 2)} 赵 云^{1)**} 杭海英^{1)**}

¹⁾中国科学院生物物理研究所, 生物大分子国家重点实验室, 蛋白质与多肽药物所重点实验室, 北京 100101;

²⁾中国科学院大学, 北京 100049)

摘要 新近的研究发现, 微生物群体异质性现象普遍存在, 与微生物群体许多关键功能密切相关。微生物群体中的多种异质性状态需要单细胞水平的分析技术才能被揭示, 流式细胞术是获取异质性状态精确分布的重要工具。但微生物细胞尺寸微小、生物分子含量少、常常缺乏特异性试剂等都限制着传统流式细胞技术在微生物研究领域的应用。本论文采用新型的低背景、高灵敏度和高分辨率流式细胞仪, 以增强的前向散射光、侧向散射光以及紫外光激发的细菌自发荧光水平这三个无需任何荧光标记就可以检测的信号为参数, 首次揭示出不同生长状态的枯草芽孢杆菌具有复杂、动态的异质性状态分布。这一方法鉴定出的枯草芽孢杆菌多种状态及其与生理功能相关的、高度关联的变化, 可能对该菌的生理变化规律及其分子机理的认识提供新的机遇。本论文也讨论了这一采用新型高灵敏度、高分辨率流式细胞仪测量非标记细胞参数的方法对于广泛开展各种微生物多态性研究具有巨大潜力。

关键词 微生物异质性, 流式细胞术, 枯草芽孢杆菌, 前向散射光, 侧向散射光, NAD(P)H

学科分类号 Q93, Q939.1, Q2

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2013.00099

即使是实验室中培养的单克隆和由单个克隆生长而来的微生物群体, 每一个细胞之间都能在遗传、生理、生化、行为等方面表现出广泛的差异性^[1-3], 这种现象被称为微生物异质性(microbial heterogeneity), 它是自然界中的微生物群体在多变、甚至完全相反的环境中生存的一种成功策略^[4-6]。对微生物异质性现象的存在及重要性认识的深入, 极大促进了对单个微生物细胞水平(single-cell level)分析技术的需求^[3, 7], 因为只有能够在单细胞水平上测量一个微生物群体当中尽可能多数量的细胞个体, 才能获得这一微生物群体在一个或多个生理参数上的精准分布模式。

流式细胞术是一种单细胞技术, 具有高通量、高灵敏度、多参数精确定量测量和优越的多参数关联分析功能, 正好符合获取细胞群体在生理参数上的精确分布的要求。流式细胞术所具备的细胞分选功能可以高通量、高纯度地分离、富集特定状态(或表型)的细胞亚群, 这样又非常方便地为后继的深入研究提供了有力保障。因而, 流式细胞术被认为是当前研究微生物群体异质性现象的一种最有力

的、高效的工具^[2-3, 7-9]。

当前流式细胞术在微生物研究领域的广泛应用还面临着一些阻碍。微生物细胞的体积、DNA 和蛋白质等大分子含量等通常相应地比哺乳动物细胞低三个数量级^[9], 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^[10-11], 信噪比低。当前, 针对哺乳动物细胞开发的试剂、药物、荧光染料等非常丰富, 但微生物种类极多, 专门针对不同微生物开发的试剂及工具还很缺乏^[9, 12]。不同种属的微生物细胞对荧光染料的吸收、泵出、分子相互作用等也会存在很大差别^[13-18], 影响着染色方案的同时, 又成为染色结果的主要干扰来源^[12]。另外, 微生物对环境变化高度敏感, 实验前处理如

* 国家重点基础研究发展计划(973)(2011CBA00906), 科技部重大仪器专项基金(2011YQ03013404)和生物大分子国家重点实验室开放基金(2013kf01)资助项目。

** 通讯联系人。

赵 云. Tel/Fax: 010-64888473, E-mail: super@moon.ibp.ac.cn

杭海英. Tel/Fax: 010-64888473, E-mail: hh91@sun5.ibp.ac.cn

收稿日期: 2013-03-13, 接受日期: 2013-05-06

荧光染色等也很可能干扰甚至改变微生物群体的原有状态. 上述问题连同其他一些困扰如数据解释等^[10]都限制着当前流式细胞术在微生物学研究中的广泛应用.

我们注意到, 在流式细胞术中, 任何细胞不需进行任何荧光标记或其他处理, 都可以直接测量其前向散射光信号(forward scattering, FSC)、侧向散射光信号(side scattering, SSC)和细胞自发荧光(autofluorescence)三个特征参数. 在流式细胞仪测量当中, FSC 信号是收集沿着入射光方向的一个小空间角度范围内被细胞衍射、散射的光信号, 信号强弱主要依赖于细胞大小(cell size), 而在很大程度上与细胞的折射系数和形状无关^[19-21]. SSC 信号是在与入射光和流动细胞垂直的侧面, 收集细胞内部的颗粒性结构、不规则表面等反射到该角度的入射光, 对亚细胞颗粒变化敏感, 它反映的是胞内颗粒度(granularity). 细胞在波长 350 nm 左右的紫外光照射下自发荧光主要来自于代谢相关的能量复合物 NADH/NADPH (nicotinamide-adenine dinucleotide/phosphate)及少量 FMN、FAD 等辅因子^[22], 一些研究已建立了这一自发荧光与代谢水平变化之间的实验关联^[23-25], 并用于食管癌的研究诊断^[26-30]及胰岛 β 细胞分选^[31]等.

流式细胞术中上述三个参数的测量因无需进行任何标记或处理而具有普适性和简便性, 可以避免许多限制而广泛应用于各种微生物的研究. 本研究对象枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)是研究得最透彻的土壤微生物之一, 是一种典型的能形成多种分化类型并相互协作的模式细菌^[32]. 本研究使用低背景噪声、高灵敏度和高分辨率的新型流式细胞仪 Influx(SPO)测量枯草芽孢杆菌的 FSC、SSC 及 NAD(P)H 荧光水平这三个非标记特征参数. 实验结果发现, 同遗传背景的枯草芽孢杆菌在不同生长状态可以区分为 10 个以上亚群, 用传统流式细胞仪只能区分出 3 个亚群, 并且不同状态的枯草芽孢杆菌亚群在能量代谢和存活率上存在差异.

1 材料与方法

1.1 材料

LB 培养基(0.2 μm 过滤). 标准尺寸微球(50~500 nm, Beckman-Coulter, Lot No: 9307003), 中国科学院生物物理研究所刘平生课题组惠赠. 枯草芽孢杆菌 168 菌株, 由中国科学院微生物研究所董志扬教授惠赠. 流式细胞仪校准荧光微球:

Spherotech UltraRainbow beads: URFP-30-2; FACS™ AccuDrop (BD 公司). PBS(pH 7.0): 0.1 μm 滤膜过滤. H_2O : 超纯水(0.1 μm 滤膜过滤, MilliQ).

1.2 方法

1.2.1 枯草芽孢杆菌培养与样本制备. 挑选枯草芽孢杆菌 168 菌株生长于 LB 琼脂培养板上的单个新鲜克隆, 转移至 2 ml LB 液体培养基中, 在 37℃ 恒温振荡培养箱(200 r/min)中培养过夜; 取该培养物以 1:100 比例接种至 5 ml 新鲜 LB 培养基, 于 37℃ 恒温 200 r/min 振荡培养箱培养至实验所取时间点, 并连续测量 A_{600} 数值; 收取 100 μl 菌液 6 500 g 离心 3 min, 以 PBS(pH 7.0)清洗 2 次后重悬, 所得样本进行流式细胞术测量.

1.2.2 流式细胞术分析. 细菌细胞使用 Influx(SPO)(BD 公司)进行分析, 并用 FACS Aria III 和 FACSCalibur(BD 公司)分析同一样本以做对比. 在 Influx(SPO)上以 488 nm 和 355 nm 激发光检测细菌, 分别收集 FSC、SSC 散射光信号和 420~480 nm 波长范围的荧光信号. 所得数据以仪器自带软件进行参数分布的显示、分析.

2 实验结果

2.1 比较 Influx(SPO)与 FACS Aria III 对微小颗粒 FSC、SSC 信号的测量能力

在流式细胞术中, 前向散射光信号 FSC 与细胞大小正相关. 传统流式细胞仪通常收集正对 488 nm 激光入射方向周围约 2°~15°空间角度范围内被细胞衍射、散射的激光作为 FSC, 以光敏二极管测量光信号强度. 本实验所使用的流式细胞仪 Influx 配备了创新的小颗粒探测组件(small particle option, SPO), 能够收集前向 2°~30°范围内的散射光并过滤干扰信号, 使信噪比提高 200 倍^[33], 同时使用灵敏度极高的光电倍增管(PMT)作为光信号测量元件, 因而大幅提高了这台仪器对微小颗粒 FSC 信号的灵敏度和分辨率.

首先采用一系列不同尺寸的标准微球来测试配备 SPO 的 Influx 对微小颗粒散射光信号的灵敏度(由能与背景噪声分离的最小颗粒尺寸反映)和分辨率(即精确度, 由分布单峰的变异系数(coefficient of variance, CV)表示; CV 越小, 单峰分布越窄, 越能分辨微小的差别), 并与 FACS Aria III 进行比较, 后者是传统的 FSC 测量方式. 标准微球直径大小分别是: 500、300、200、100 和 50 nm. 测量结果如图 1 所示.

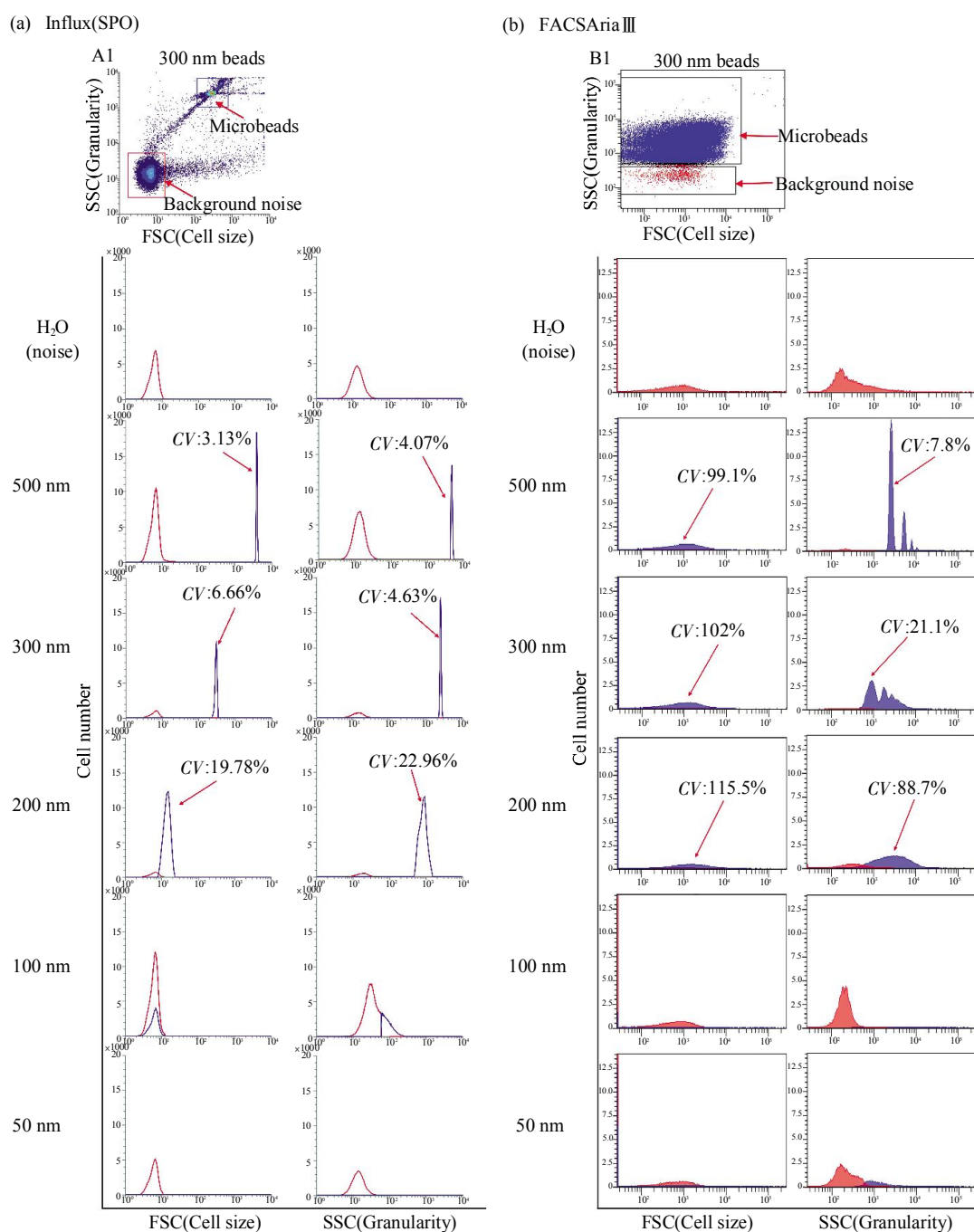


Fig. 1 Comparison of the flow cytometers Influx(SPO) and FACS Aria III on their FSC and SSC signals derived from microbeads

The two FSC-SSC bivariate plots (A1, B1) at the top of (a) and (b) are examples for showing how to select and gate microbeads populations. It should be noted that microbeads with other sizes are not in the same gating regions. Distribution peaks in the one dimension histograms are gated by similar way, among which red peaks are the distribution of background noises gated from FSC-SSC plot and all the blue curves are the distribution of calibrated beads.

图 1 展示的结果中, 在 FSC 信号上, Influx (SPO)可以检测到 200 nm 及更大的微球分布成小

CV 的锐利单峰, 并与来自激光的背景噪声区分开; FACS Aria III测量的各种大小微球的 FSC 分布峰都

具有极大的 CV 且与背景噪声几乎完全重叠, 不能形成锐利的分布峰. 在 SSC 信号上, $Influx(SPO)$ 可以清晰地检测到 200 nm 标准微球小 CV 的锐利分布峰, 甚至 100 nm 颗粒的分布也与背景噪声有所区别; $FACSAriaIII$ 在 SSC 信号上可以较清晰地检测出 300 nm 及以上标准微球的分布峰, 但 CV 更大分布更宽. 此外可以注意到, 微球尺寸从 200 nm 增加到 300 nm 、 300 nm 增加到 500 nm , $Influx(SPO)$ 产生的 FSC 信号峰值强度都有约 10 倍的剧烈增大, SSC 信号峰值强度也有 2 倍的增加, 而 $FACSAriaIII$ 产生的信号则没有这种高度灵敏的变化. 以上结果表明, $Influx(SPO)$ 相对于 $FACSAriaIII$ 具有高得多的散射光分辨率和灵敏度, 可以精确分析直径大于 200 nm 的样本.

枯草芽孢杆菌单个细胞大小为 $0.7\sim 0.8\text{ }\mu\text{m}\times 2\sim 3\text{ }\mu\text{m}$, 芽孢为 $0.6\sim 0.9\text{ }\mu\text{m}\times 1.0\sim 1.5\text{ }\mu\text{m}$, 都在 $Influx(SPO)$ 精确测量范围内. 下文中, 在 $Influx(SPO)$ 测量的 FSC - SSC 双参数图上能够分辨出许多差异微小的细菌亚群, 而 $FACSAriaIII$ 得不到同等结果(图 3, 4). 我们也比较了流式细胞仪 $FACSAriaIII$ 和 $FACSCalibur$ 检测小颗粒的能力, 发现后者的检测能力不比前者强(未发表数据).

2.2 流式细胞仪 $Influx(SPO)$ 揭示枯草芽孢杆菌高度多态性

以新鲜 LB 培养基分批培养枯草芽孢杆菌, $1:100$ 接种后, 取不同时间点的培养物测量吸光值(A_{600})并进行流式细胞仪分析. 首先根据 A 值的采样测定绘出了枯草芽孢杆菌 168 菌株的生长曲线(图 2). 枯草芽孢杆菌大约在培养 $0\sim 3\text{ h}$ 的时间段里处于延迟期, $3\sim 12\text{ h}$ 期间为指数生长期, 12 h 后进入平台期, 约 48 h 后又趋于平稳.

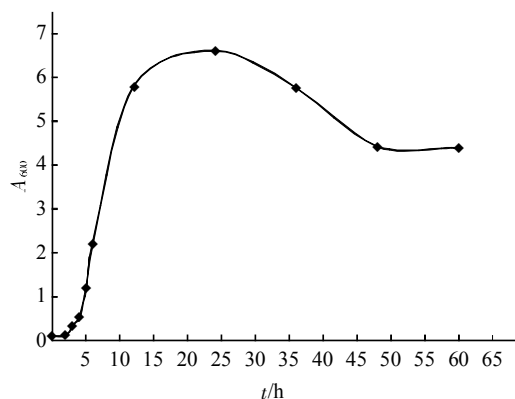


Fig. 2 Growth Curve of *Bacillus subtilis* strain 168 in LB liquid medium

取培养至上述各个时间点的枯草芽孢杆菌作为样本, 使用流式细胞仪 $Influx(SPO)$ 测量 FSC (cell size)和 SSC (granularity). 图 3 所示的系列 FSC - SSC 二维图上, 细菌分别聚集在不同区域, 表明这些细菌在大小与颗粒度联合参数上有明显差异, 是不同状态或分化类型的细菌亚群. 在不同生长阶段的样本中, 各个亚群的中心坐标、聚集范围和分布形状均有显著变化(例如, 比较图 3e 和 1), 呈现出复杂、动态的异质性亚群分布. 这些样本中最多的可以辨认出多达 7、8 个不同的亚聚类分布区(图 3b, e; 图 4c), 而枯草芽孢杆菌总共展现出的亚群数不少于 10 个.

图 3d, e 显示已进入对数生长早期的枯草芽孢杆菌以具有最高颗粒度和较大细胞尺寸的亚群为主, 同时存在众多低比例的分布亚群; 此后继续生长的细菌分布成 FSC 几乎相同而 SSC 相差显著的两个亚群(图 3f~h). 这个结果表明, 对数生长期的枯草芽孢杆菌群体生理状态发生了重大改变. 这一现象未见报道.

生长延迟期、平台期的枯草芽孢杆菌当中包含 FSC 信号最大的亚群(图 3a~c, i~m 右上角), 并且亚群分布繁多. 这一现象或者可以理解为, 分批培养 24 h 进入平台期的细菌分化为多种亚群以适应营养缺乏和代谢废物增加的不利环境. 平台期细菌在接种后可获得充足的营养, 进入延迟期, 但不同状态/分化类型的亚群对环境条件的响应和进入快速生长期的先后各不相同, 因而在这两个阶段都可检测出众多细菌亚群且分布模式近似(对比图 3a 和 i). 据此, 我们将生长到 $A=1.0$ 的枯草芽孢杆菌以 $1:100$ 稀释接种, 连续 3 次, 然后收取 $A=0.6$ 的细菌进行检测. 结果显示, 细菌分布高度统一(图 3n), 不再呈现多状态分布(对比图 3n, c), 并且其分布模式与对数生长早期样本非常相似(对比图 3n 和图 3d, e), 全由高颗粒度尺寸较大的细胞亚群组成, 图 6 显示, 这一群细胞的代谢水平也是最高的. 这表明在持续良好的营养条件下, 平台期分化形成的各个细菌亚群趋于一致并保持在对数生长早期的快速生长状态. 这一结果为上面的解释提供了进一步的依据, 同时, 反过来也表明, 前述的对数生长期枯草芽孢杆菌分布模式发生重大改变之时, 可能就是整个细菌群体进行调控适应渐变的增长环境的开始.

图 3k~m 表明, 分批培养 48 h 之后, 直到 190 h , 枯草芽孢杆菌各细菌亚群分布模式基本保

持不变. 事实上, 经过长达 480 h 的培养, 这一分布模式也能保持不变(未发表数据). 枯草芽孢杆菌在营养缺乏时产生芽孢, 因此可以推测, 在长时间

培养的平台期和生长延迟期培养物中数目众多的、尺寸及颗粒度都最小的颗粒(图 3a~c、i~m 左下角)可能是芽孢, 当然这一点需要进一步研究.

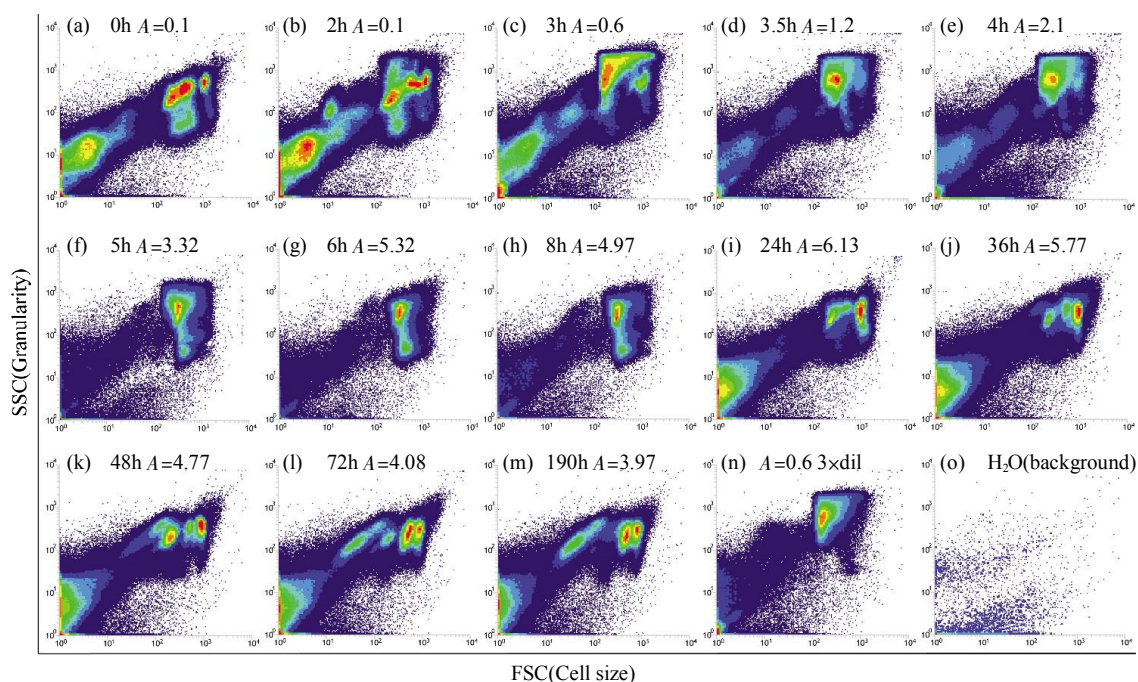


Fig. 3 FSC-SSC bivariate distribution plots of subpopulations of *Bacillus subtilis* strain 168 at various growth stages
(a~m) An overnight culture of *Bacillus subtilis* was seeded by 1 : 100 and cultured for 0~190 h. The culture time and *A* values for all samples are labeled above FSC-SSC plots. (n) After *A* value increasing to 1.0, the culture was diluted 1 : 100 into fresh medium and cultured again under similar conditions. The dilution/growth cycle was repeated three times. (o) Using ultrapure water (filtered by 0.1 μ m) as a sample to check the background noise level.

图 4 显示, 与 Influx(SPO)相比, 同一枯草芽孢杆菌样本在 FACS Aria III 和 FACSCalibur 测量的 FSC-SSC 分布图上, 能分辨的细菌亚群不超过 3 个, 聚类分布缺乏细节, 它们对不同生长状态的细菌亚群的辨识能力明显不如 Influx(SPO). 并且, Influx(SPO)检测的背景噪声小于细胞信号的 2% (图 4a), 而 FACS Aria III 和 FACSCalibur 此时的背景噪声水平非常高(图 4f, k), 且与细菌分布区域重叠(图 4g, h, l, m, o). Influx(SPO)检测出的尺寸和颗粒度都相对最小的颗粒(图 3a~e、i~m 左下角)在 FACS Aria III 和 FACSCalibur 检测结果中难以将它与背景噪声分开. 上述实验结果及对比表明, 在高灵敏度、高分辨率测量下的 FSC 和 SSC 参数可以揭示出枯草芽孢杆菌群体复杂的异质性分布.

2.3 Influx(SPO)揭示枯草芽孢杆菌 NAD(P)H 水平与细菌颗粒度相关

NAD(P)H 是合成代谢中重要的能量提供者, 紫外 / 近紫外光激发的结合和自由态 NAD(P)H 在 465 nm 和 445 nm 处为发射峰值. 因此我们以 355 nm 紫外光激发, 收集波长在 420~480 nm 范围内的荧光信号作为单细胞 NAD(P)H 水平. 图 5 显示, 接种培养后 6 h 内, 细菌的 NAD(P)H 荧光信号逐渐升高, 在 6 h 达到了最高, 之后随着培养时间的延长而降低. 这个趋势符合细菌的生长曲线, 6 h 的枯草芽孢杆菌细胞处于快速分裂生长的指数期中段, NAD(P)H 含量也达到高水平, 表明此时细胞的代谢活动也最为旺盛. 培养 6 h 之后的枯草芽孢杆菌细胞 NAD(P)H 荧光开始降低, 指示合成代谢活动降低.

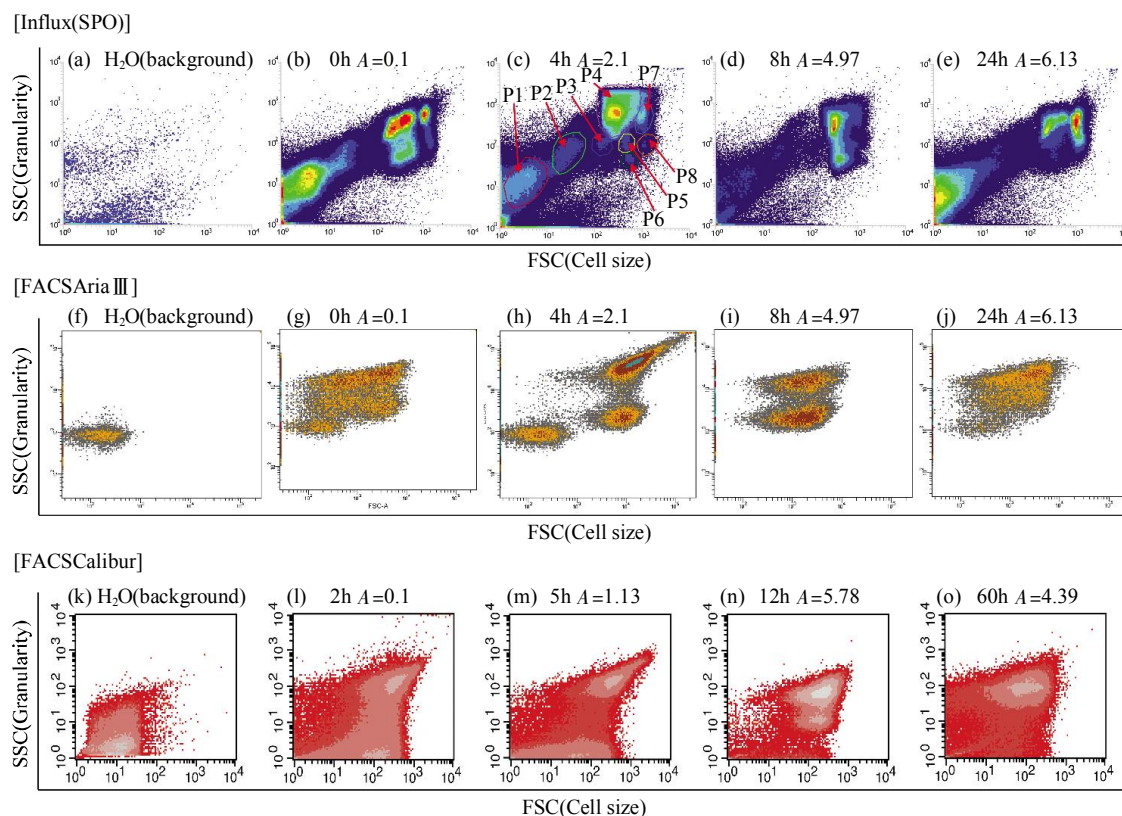


Fig. 4 Comparison of Influx(SPO), FACS Aria III and FACSCalibur on their FSC and SSC signals collected from *Bacillus subtilis* at various growth stages

0.1 μm filtered ultrapure water was used as a sample to determine background noise level and data were acquired for 60 s consistently when run on different flow cytometers (a, f, k). The same plots as Figure 3 are listed here again just for the convenience of comparison (b~e). We can identify and gate out 8 subpopulations of *Bacillus subtilis* as shown on the plot (c) that measured by Influx (SPO).

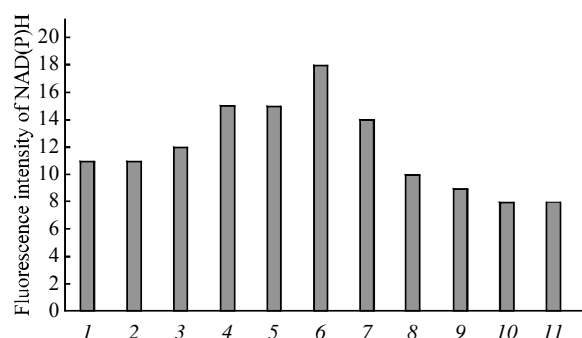


Fig. 5 NAD(P)H levels of *Bacillus subtilis* at various growth stages by monitoring autofluorescence using Influx(SPO)

The NAD(P)H fluorescence intensity of *Bacillus subtilis* were acquired by using 355 nm UV excitation and 420~480 nm emission. 1: 0h, A=0.1; 2: 2h, A=0.1; 3: 3h, A=0.43; 4: 4h, A=0.51; 5: 5h, A=1.175; 6: 6h, A=2.2; 7: 12h, A=5.78; 8: 24h, A=6.61; 9: 36h, A=5.76; 10: 48h, A=4.33; 11: 60h, A=4.39.

Influx(SPO)对枯草芽孢杆菌多亚群的高分辨能力为分析单个亚群细菌的合成代谢状态提供了机会。如图6所示,单个细菌亚群NAD(P)H水平有差异,最显著的是培养3 h, A=0.6的样本中(图6b, c)颗粒度最大的P3亚群的NAD(P)H明显高于其他亚群。图6b中P3、P5、P4、P2和P1亚群的NAD(P)H水平依次降低,它们的SSC信号也是由高到低。这一现象还未见文献报道。注意到图6b和c的样本都是处于快速分裂生长状态,可以合理推测,营养充足时细菌快速生长和分裂增殖,必定进行非常旺盛的代谢合成活动,相应的细胞内部的细胞器及亚结构也必然发育增多,从而检测出高NAD(P)H水平和高颗粒度。不同的是,细胞大小与NAD(P)H水平的相关性则不强,培养48和190 h样本中FSC最大的P4亚群(图6d, e, i, j)比

3 h 样本的 P3 亚群更大, 但其 NAD(P)H 水平却比 P3 亚群低, 细胞内颗粒度也较小。

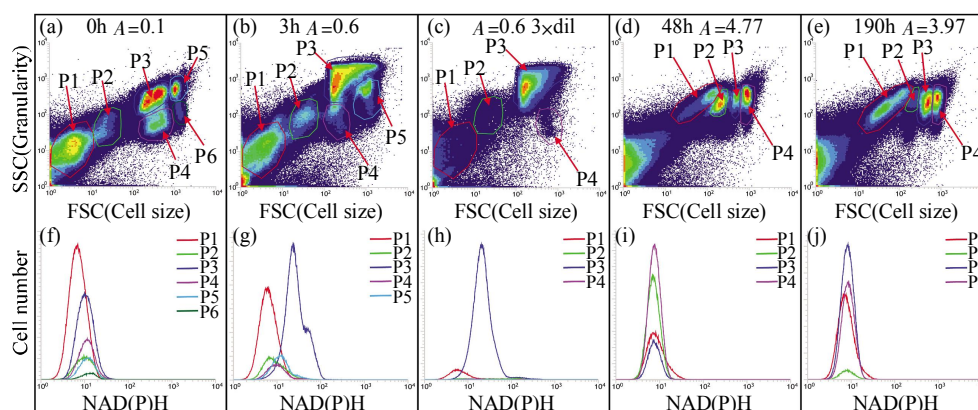


Fig. 6 NAD(P)H levels of every subpopulation of *Bacillus subtilis* at various growth stages by monitoring autofluorescence using Influx(SPO)

On it's SSC-FSC bivariate plot, *Bacillus subtilis* of different growth states exhibited widely varied distribution modes (a~e). Note that these plots are same as those with identical name in Figure 3. But here we separately gate out and name every subpopulation as shown on each plot (a~e) and analyze it's NAD(P)H signal respectively (f~j).

2.4 不同生长阶段的枯草芽孢杆菌亚群克隆形成率有所差别

利用流式细胞仪的分选功能, 可以对各个枯草芽孢杆菌亚群进行纯化富集。我们分选出了上述 5、12 和 60 h 样本当中不同分布状态的枯草芽孢杆菌亚群(图 7a), 在 LB 培养板上观察各个细菌亚群克隆形成情况。如图 7b 所示, 5 h 样本的细菌亚群 P1 和 P2 的克隆形成率最高且一致, 12 h 和 60 h 的细菌克隆形成率明显降低, 但 12 h 的两个亚群克隆形成率仍高度一致。不同的是, 60 h 样本中的 P2 和 P4 亚群克隆形成率不比培养 12 h 的低, 但 60 h 样本的各个亚群克隆形成率相差显著, 克隆形成率最高的 P2 和 P4 亚群在培养 72、190(图 3l, m) 和 480 h(未发表数据)的样本中一直存在。这表明, 它们可能也具有很强的极端环境耐受能力, 这一现象值得进一步研究。

5 h 样本中 P1 和 P2 亚群存活率虽然没有区别, 但细胞内颗粒度(SSC 信号)却非常不同(图 7b, e)。进行流式细胞术分选后用光学显微镜观察, 发现这两个细胞亚群的细胞形态截然不同, P1 亚群呈杆状而 P2 亚群细菌呈球形(图 8)。另外, 在光镜下 P2 比 P1 的尺寸小得多。5 h 样本中这一 P2 亚群细菌的身份是什么也未见报道。一直以来, 大家认为 FSC 反映细胞大小, SSC 反映细胞内颗粒度。图 7 显示 P1 亚群的 FSC 比 P2 亚群小, 而图 8 的光学

显微镜观察发现 P1 亚群细菌尺寸明显比 P2 亚群大。这个例子显然与该领域的共识有矛盾。也许, 在分析小尺寸生物样本时这个规律不一定成立, 该问题值得进一步系统研究。

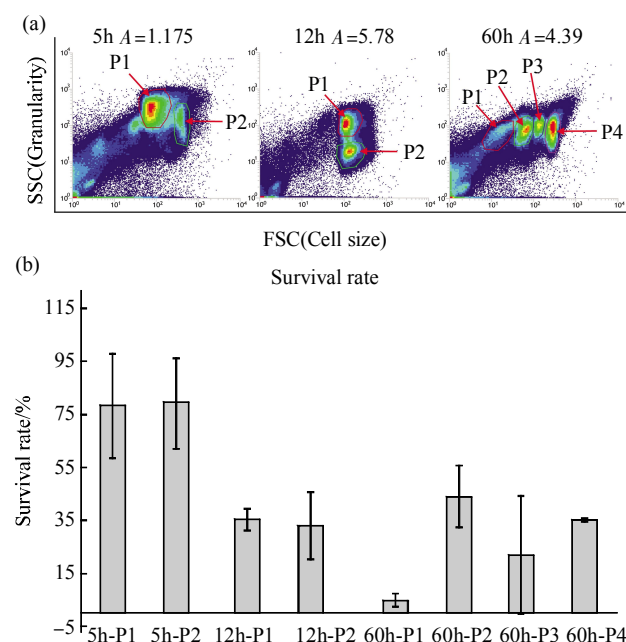


Fig. 7 Colony-forming abilities of Influx (SPO)-sorted subpopulations of *Bacillus subtilis* at different growth stages. Cell subpopulations distribution at different growth stages and the sorting gates are shown on (a). Cloning efficiency of each sorted subpopulation is displayed on (b). 1000 *Bacillus subtilis* cells sorted by Influx (SPO) were plated on 100 mm culture dish overnight.

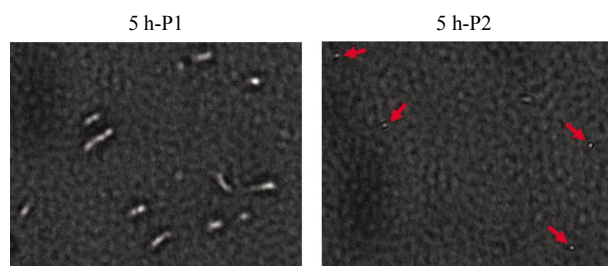


Fig. 8 Phase contrast microscopy images on Influx (SPO)-sorted P1 and P2 subpopulations of *Bacillus subtilis* at the 5 h growth stage

P1 and P2 subpopulations from 5 h cultured *Bacillus subtilis* were enriched via Influx (SPO) sorting. The Gating strategy for sorting was identical with Figure 7a. When observed by a microscope, it can be found that bacterial cells of P1 subpopulation presented rod shape but cells from P2 appeared spherical shape (pointed out by the red arrows in right picture).

3 讨 论

本研究使用增强了微小颗粒测量能力的流式细胞仪 Influx (SPO), 经与传统的流式细胞仪 FACS Aria III 和 FACSCalibur 比较, 显示 Influx (SPO) 的 FSC 和 SSC 参数具有远高于后两者的分辨率和灵敏度 (图 1; 未发表数据); 同时还发现 Influx (SPO) 在检测微生物样本时噪声颗粒远低于 FACS Aria III 和 FACSCalibur (图 4)。进而 Influx (SPO) 检测分批培养的枯草芽孢杆菌的结果清楚显示, 不同生长阶段的枯草芽孢杆菌复杂的、高度动态的异质性状态分布, 其亚群分布特征与生长阶段高度关联, 枯草芽孢杆菌培养物总共展现出 10 种以上的不同亚群。比较而言, FACS Aria III 和 FACSCalibur 至多只能区分出 3 种亚群。

本论文通过高灵敏度、高分辨率流式细胞术的测量, 首先发现了分批培养的枯草芽孢杆菌培养物包含丰富的异质性细菌亚群, 同时也揭示出各种异质性细菌亚群的组成分布模式随着生长阶段的不同而有着显著差异等现象。我们还发现, 对数生长期的枯草芽孢杆菌有两种截然不同的亚群分布模式, 而分布模式发生变化的时间很可能就是分批培养的枯草芽孢杆菌群体为适应渐为恶化的生长环境而开始调控细菌亚群分化的时间。上述的新现象为揭示枯草芽孢杆菌新的环境响应机制和分化调控机理等提供了新机遇。

根据已有的研究, 枯草芽孢杆菌在不同培养条件下可以分化形成多种表型、功能截然不同的细胞类型, 包括感受态细胞^[34-35]、运动型细胞^[36]、生产 /

分解胞外基质的细胞^[37-40]、生产表面活性肽 (surfactin) 的细胞^[41-43]以及分泌毒素杀死或吞食非孢子化同类的细胞类型^[44]。这些类型的细胞各具特异的基因表达模式, 通常是以分子探针检测细胞类型特异性基因表达来进行识别^[32]。本论文的实验结果也为建立起上述细菌的分化类型与 FSC-SSC 双参数图分布特征之间的关联提供了可能。建立这种稳定关联, 将可以简单地通过测量 FSC-SSC 分布特征而识别和纯化富集特定分化类型的枯草芽孢杆菌, 甚至在高灵敏度、高分辨率的流式细胞术测量所揭示的丰富细菌亚群中可能发现新分化类型的细菌。比如, 在分批培养 60 h 的枯草芽孢杆菌培养液中发现 FSC 信号很大的细菌亚群 (图 3, 7) 平板克隆形成率仍能达到 35% (图 7), 以及颗粒度明显不同的两个细胞亚群具有相同的克隆形成率 (图 7) 等, 都是值得关注的。

另一方面, 本论文的实验结果从方法学上表明, 传统流式细胞仪的 FSC 和 SSC 信号对微生物细胞的灵敏度、分辨率不足, 并且受高背景噪声干扰, 难以进一步精确检测微生物细胞, 而高灵敏度、高分辨率的 FSC 和 SSC 信号能够精确定量检测并分辨微生物细胞及细胞间更微小的差异, 克服了微生物细胞信号微弱的限制, 成功揭示出枯草芽孢杆菌群体复杂的异质性分布。同时, 更由于 FSC、SSC 以及紫外激发以 NAD(P)H 为主的细胞自发荧光都不需进行任何染色或试剂处理, 因而不受特异性试剂缺乏的限制, 也避免了实验处理对微生物群体生理状态的影响以及不稳定的染色结果等。流式细胞术高通量高纯度的细胞分选功能又保证了对特定状态细菌亚群的富集, 为进一步研究提供有力保障。故而我们认为, 这一方法可以方便地应用于各种微生物群体异质性现象及后继的功能和机理研究。当前微生物异质性现象渐受重视, 相关研究和讨论也很多^[2-3, 7-8, 11], 但目前还未见有其他文献报道同时展现众多异质性状态细菌亚群的实验结果。此外, 高灵敏度、高分辨率检测的这三个非标记参数可以非常方便地加上其他特异性荧光参数, 共同描绘微生物群体。因此本论文的研究方法可以为广泛研究微生物异质性现象及其内在机理提供简便、精确、高效的手段和灵活的空间, 具有巨大的应用潜力。

参 考 文 献

- [1] Choo-Smith L P, Maquelin K, van Vreeswijk T, et al. Investigating

- microbial (micro) colony heterogeneity by vibrational spectroscopy. *Appl Environ Microbiol*, 2001, **67**(4): 1461–1469
- [2] Brehm-Stecher B F, Johnson E A. Single-cell microbiology: tools, technologies, and applications. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2004, **68**(3): 538–559
- [3] Davey H M, Kell D B. Flow cytometry and cell sorting of heterogeneous microbial populations: the importance of single-cell analyses. *Microbiol Rev*, 1996, **60**(4): 641–696
- [4] Koch A. Similarities and differences of individual bacteria within a clone, 2 edn. Washington, D.C.: ASM Press; 1996
- [5] Hallet B. Playing Dr Jekyll and Mr Hyde: combined mechanisms of phase variation in bacteria. *Curr Opin Microbiol*, 2001, **4**(5): 570–581
- [6] Booth I R. Stress and the single cell: intrapopulation diversity is a mechanism to ensure survival upon exposure to stress. *Inter J Food Microbiol*, 2002, **78**(1–2): 19–30
- [7] Shapiro H M. Microbial analysis at the single-cell level: tasks and techniques. *J Microbiol Method*, 2000, **42**(1): 3–16
- [8] Davey H M, Winson M K. Using flow cytometry to quantify microbial heterogeneity. *Curr Issues Mol Biol*, 2003, **5**(1): 9–15
- [9] Vives-Rego J, Lebaron P, Nebe-von Caron G. Current and future applications of flow cytometry in aquatic microbiology. *FEMS Microbiol Rev*, 2000, **24**(4): 429–448
- [10] Nebe-von-Caron G. Standardization in microbial cytometry. *Cytometry Part A: The Journal of The International Society for Analytical Cytology*, 2009, **75**(2): 86–89
- [11] D.A. Veal D D, Ferrari B, Piper J, *et al.* Fluorescence staining and flow cytometry for monitoring microbial cells. *J Immunol Method*, 2000, **243**(1–2): 191–210
- [12] Haugland R P. Handbook of Fluorescent Probes and Re-search Chemicals, 6th edn: Molecular Probes, Eugene, OR; 1996
- [13] Walberg M, Gaustad P, Steen H B. Uptake kinetics of nucleic acid targeting dyes in *S. aureus*, *E. faecalis* and *B. cereus*: a flow cytometric study. *J Microbiol Method*, 1999, **35**(2): 167–176
- [14] Jernaes M W, Steen H B. Staining of *Escherichia coli* for flow cytometry: influx and efflux of ethidium bromide. *Cytometry*, 1994, **17**(4): 302–309
- [15] Glaasker E, Konings W N, Poolman B. The application of pH-sensitive fluorescent dyes in lactic acid bacteria reveals distinct extrusion systems for unmodified and conjugated dyes. *Mol Memb Biol*, 1996, **13**(3): 173–181
- [16] Draper M P, Martell R L, Levy S B. Active efflux of the free acid form of the fluorescent dye 2', 7'-bis (2-carboxyethyl)-5 (6)-carboxyfluorescein in multidrug-resistance-protein-overexpressing murine and human leukemia cells. *Euro J Biochem/FEBS*, 1997, **243**(1–2): 219–224
- [17] Molenaar D, Bolhuis H, Abee T, *et al.* The efflux of a fluorescent probe is catalyzed by an ATP-driven extrusion system in *Lactococcus lactis*. *J Bacteriol*, 1992, **174**(10): 3118–3124
- [18] Ueckert J, Breeuwer P, Abee T, *et al.* Flow cytometry applications in physiological study and detection of foodborne microorganisms. *Inter J Food Microbiol*, 1995, **28**(2): 317–326
- [19] Mullaney P F, Dean P N. Cell sizing: a small-angle light-scattering method for sizing particles of low relative refractive index. *Appl Optics*, 1969, **8**(11): 2361–2362
- [20] Mullaney P F, Van Dilla M A, Coulter J R, *et al.* Cell sizing: a light scattering photometer for rapid volume determination. *Rev Sci Instrum*, 1969, **40**(8): 1029–1032
- [21] Kerker M, Chew H, McNulty P J, *et al.* Light scattering and fluorescence by small particles having internal structure. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry : Official Journal of the Histochemistry Society*, 1979, **27**(1): 250–263
- [22] Villette S, Pigaglio-Deshayes S, Vever-Bizet C, *et al.* Ultraviolet-induced autofluorescence characterization of normal and tumoral esophageal epithelium cells with quantitation of NAD (P)H. *Photochemical & photobiological sciences : Official Journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology*, 2006, **5**(5): 483–492
- [23] Chance B, Thorell B. Localization and kinetics of reduced pyridine nucleotide in living cells by microfluorometry. *J Biol Chem*, 1959, **234**(11): 3044–3050
- [24] Chance B. Optical method. *Annu Rev Biophys Biophys Chem*, 1991, **20**: 1–28
- [25] Galeotti T, van Rossum G D, Mayer D H, *et al.* On the fluorescence of NAD (P)H in whole-cell preparations of tumours and normal tissues. *Euro J Biochem/FEBS*, 1970, **17**(3): 485–496
- [26] Anjehpour M, Overholt B F, Schmidhammer J L, *et al.* Spectroscopic diagnosis of esophageal cancer: new classification model, improved measurement system. *Gastrointestinal Endoscopy*, 1995, **41** (6): 577–581
- [27] Vo-Dinh T, Panjehpour M, Overholt B F, *et al.* *In vivo* cancer diagnosis of the esophagus using differential normalized fluorescence (DNF) indices. *Las Surg Med*, 1995, **16**(1): 41–47
- [28] Panjehpour M, Overholt B F, Vo-Dinh T, *et al.* Endoscopic fluorescence detection of high-grade dysplasia in Barrett's esophagus. *Gastroenterology*, 1996, **111**(1): 93–101
- [29] Bourg-Heckly G, Blais J, Padilla J J, *et al.* Endoscopic ultraviolet-induced autofluorescence spectroscopy of the esophagus: tissue characterization and potential for early cancer diagnosis. *Endoscopy*, 2000, **32**(10): 756–765
- [30] Georgakoudi I, Jacobson B C, Van Dam J, *et al.* Fluorescence, reflectance, and light-scattering spectroscopy for evaluating dysplasia in patients with Barrett 's esophagus. *Gastroenterology*, 2001, **120**(7): 1620–1629
- [31] Smelt M J, Faas M M, de Haan B J, *et al.* Pancreatic beta-cell purification by altering FAD and NAD (P)H metabolism. *Exper Diab Res*, 2008, **2008**: 165360
- [32] Lopez D, Vlamakis H, Kolter R. Generation of multiple cell types in *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiol Rev*, 2009, **33**(1): 152–163
- [33] Petersen T W, Brent Harrison C, Horner D N, *et al.* Flow cytometric characterization of marine microbes. *Methods*, 2012, **57**(3): 350–358
- [34] Dubnau D. Genetic competence in *Bacillus subtilis*. *Microbiol Rev*, 1991, **55**(3): 395–424
- [35] Dubnau D P R. Internalizing DNA. *Res Microbiol*, 2000, **151**(6): 475–480
- [36] Kearns D B, Losick R. Cell population heterogeneity during growth of *Bacillus subtilis*. *Genes & Development*, 2005, **19**(24): 3083–3094
- [37] Chai Y, Chu F, Kolter R, *et al.* Bistability and biofilm formation in

- Bacillus subtilis*. Mol Microbiol, 2008, **67**(2): 254–263
- [38] Vlamakis H, Aguilar C, Losick R, *et al.* Control of cell fate by the formation of an architecturally complex bacterial community. Genes & Development, 2008, **22**(7): 945–953
- [39] Lopez D, Fischbach M A, Chu F, *et al.* Structurally diverse natural products that cause potassium leakage trigger multicellularity in *Bacillus subtilis*. Proc Natl Acad Sci USA, 2009, **106**(1): 280–285
- [40] Lopez D, Vlamakis H, Losick R, *et al.* Cannibalism enhances biofilm development in *Bacillus subtilis*. Mol Microbiol, 2009, **74**(3): 609–618
- [41] Arima K, Kakinuma A, Tamura G. Surfactin, a crystalline peptidelipid surfactant produced by *Bacillus subtilis*: isolation, characterization and its inhibition of fibrin clot formation. Biochem Biophys Res Commun, 1968, **31**(3): 488–494
- [42] Kluge B, Vater J, Salnikow J, *et al.* Studies on the biosynthesis of surfactin, a lipopeptide antibiotic from *Bacillus subtilis* ATCC 21332. FEBS Letters, 1988, **231**(1): 107–110
- [43] Magnuson R, Solomon J, Grossman A D. Biochemical and genetic characterization of a competence pheromone from *B. subtilis*. Cell, 1994, **77**(2): 207–216
- [44] Gonzalez-Pastor J E. Cannibalism: a social behavior in sporulating *Bacillus subtilis*. FEMS Microbiol Rev, 2011, **35**(3): 415–424

Multiple States of *Bacillus subtilis* Revealed by Flow Cytometry*

LIU Chun-Chun^{1,2)}, ZHAO Yun^{1)**}, HANG Hai-Ying^{1)**}

⁽¹⁾ Key Laboratory for Protein and Peptide Pharmaceuticals, National Laboratory of Biomacromolecules, Institute of Biophysics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China;

²⁾ University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract Recent studies revealed that heterogeneity is a general phenomenon among microbes with identical genomes, and it is closely related to physiological functions of microbes. The multiple heterogeneous states of microbes requires single-cell level tools to uncover. Flow cytometry is one of the most important methods to obtain accurate information on quantitative distribution of heterogeneous states of microbes. However, the small size, much less biomolecule contents and general lack of specific reagents limit the application of conventional flow cytometry to investigations of the heterogeneity of microbes. In this study, we applied a newly developed flow cytometer with increased resolution and sensitivity on three label-free parameters which include FSC, SSC and autofluorescence level of NAD(P)H to analyse *Bacillus subtilis*. And for the first time we revealed that the bacterial culture exhibited complicated and dynamically distributed multiple heterogeneous subgroups depended on its growth stage. This method has low background noise, high sensitivity and great resolution. The newly identified multiple subpopulations of *Bacillus subtilis* and their changes dynamically associated with the biological functions are likely to provide new opportunities to understand physiological change patterns and their underlying molecule mechanisms. We also discussed that the new method based on flow cytometric measurements of non-label parameters with high sensitivity and resolution had great potency for studies on the heterogeneity of various microbes.

Key words heterogeneity of microbial pupolation, flow cytometry, *Bacillus subtilis*, forward scattering, side scattering, NAD(P)H

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2013.00099

*This work was supported by grants from The National Basic Research Program of China (973)(2011CBA00906), The National Special Projects for Key Scientific Instruments and Equipment Development of Ministry of Science and Technology(2011YQ03013404) and The National Laboratory of Biomacromolecules(2013kf01).

**Corresponding author.

Zhao Yun. Tel/Fax: 86-10-64888268, E-mail: super@moon.ibp.ac.cn

Hang Hai-Ying. Tel/Fax: 86-10-64888473, E-mail: hh91@sun5.ibp.ac.cn

Received: March 13, 2013 Accepted: May 6, 2013