

细胞内融合基因技术 (epicPCR) 测定功能类群多样性

Diversity of Functional Microbes Detected by epicPCR Technology

沈文丽¹, 王尚^{2,*}, 邓晔^{2,3}

¹ 山东大学海洋研究院, 山东大学, 青岛, 266237; ² 中国科学院环境生物技术重点实验室, 中国科学院生态环境研究中心, 北京, 100085; ³ 中国科学院大学资源与环境学院, 中国科学院大学, 北京, 100049

*通讯作者邮箱: shangwang@rcees.ac.cn

引用格式: 沈文丽, 王尚, 邓晔. (2021). 细胞内融合基因技术 (epicPCR) 测定功能类群多样性. Bio-101 e2003724. Doi: 10.21769/BioProtoc.2003724.

How to cite: Shen, W. L., Wang, S. and Deng, Y. (2021). Diversity of Functional Microbes Detected by epicPCR Technology. Bio-101 e2003724. Doi: 10.21769/BioProtoc.2003724. (in Chinese)

摘要: 细胞内融合基因技术是一项结合了单细胞分离、融合 PCR、巢式 PCR 和测序技术的新型分子技术, 不仅可以在未培养的单细胞中将功能基因与系统发育标记基因 (如 16S rRNA 基因) 连接在一起, 而且通量高, 成本低。该技术首先通过稀释和涡旋将样品分散成单细胞体系, 然后对拟研究的系统发育基因和功能基因进行融合扩增, 随后进行巢式 PCR, 建库并进行高通量测序。细胞内融合基因技术既能够解决扩增子测序物种信息与功能信息脱节的困境, 又能够克服大规模宏基因组测序成本高、分析难且研究对象仅是优势物种的局限。

关键词: 细胞内融合基因技术, 功能基因, 融合 PCR, 巢式 PCR

材料与试剂

一、生成聚丙烯酰胺凝珠

1. 1.5 ml、2 ml、50 ml 离心管
2. PCR 小管
3. 35 μm 细胞筛
4. 0.2 μm 滤膜
5. 各种型号移液枪头
6. 双蒸水

7. 过硫酸铵 (St. Louis, MO, USA, Sigma, catalog number: A3678)
8. N,N'-双(丙烯酰)胱胺 BAC (St. Louis, MO, USA, Sigma)
9. 丙烯酰胺 (St. Louis, MO, USA, Sigma)
10. Tris-HCl (pH 7.5)
11. 氯化钾
12. 矿物油 (St. Louis, MO, USA, Sigma, catalog number: M8410)
13. 司盘 80 (St. Louis, MO, USA, Sigma, catalog number: 85548)
14. 吐温 80 (St. Louis, MO, USA, Sigma, catalog number: P8192)
15. 四甲基乙二胺 (TEMED) (St. Louis, MO, USA, Sigma)
16. 二乙醚 (St. Louis, MO, USA, Sigma)
17. 蛋白酶 K (St. Louis, MO, USA, Sigma)
18. 溶菌酶 (St. Louis, MO, USA, Sigma)

二、融合 PCR

1. 2 mm 玻璃珠
2. 2 ml 小管
3. 各种型号移液枪头
4. PCR 小管
5. ABIL EM 90
6. Triton X-100
7. 矿物油 (St. Louis, MO, USA, Sigma, catalog number: M8410)
8. 双蒸水
9. 5x Phusion HF 缓冲液
10. 超保真酶 Phusion Hot Start Flex DNA Polymerase (NEB)
11. 50 mM MgCl₂
12. 10 mM dNTPs
13. 正向引物 F1
14. 反向引物 R2
15. 融合引物 F2-R1
16. 牛血清白蛋白 BSA (molecular biology grade, NEB, Ipswich, MA, USA)

17. 吐温 20 (St. Louis, MO, USA, Sigma)
18. 乙二胺四乙酸 EDTA (St. Louis, MO, USA, Sigma)

三、破乳化释放聚丙烯酰胺凝珠

1. 1.5 ml、2 ml、50 ml 离心管
2. 各种型号移液枪头
3. 双蒸水
4. 二乙醚 (St. Louis, MO, USA, Sigma)
5. 乙酸乙酯 (St. Louis, MO, USA, Sigma)
6. AMPure XP 磁珠 (Beckman Coulter, Danvers, MA, USA)
7. 无水乙醇

四、巢式 PCR

1. 1.5 ml、2 ml、50 ml 离心管
2. PCR 小管
3. 各种型号移液枪头
4. 双蒸水
5. 超保真酶 Phusion Hot Start Flex DNA Polymerase (NEB)
6. 5x Phusion HF 缓冲液
7. 50 mM MgCl₂
8. 10 mM dNTPs
9. 正向引物 F3
10. 反向引物 R3
11. 阻断引物 blockF
12. 阻断引物 blockR
13. SYBR Green I 核酸染色试剂盒 (10,000x, Invitrogen, Waltham, MA, USA)

表 1. 本项目中融合硫酸盐还原菌的功能基因 dsrB 和 16S rRNA 所使用的引物信息

引物名称	引物序列 (5'-3')
F1 (dsrB-F1)	GTGTAGCAGTTACCGCA
R1-F2 (dsrB-R1_519R)	GWATTACCGCGGCKGCTGTGCCTSAAYATGTGYGGYG
R2 (1492)	GGTTACCTTGTTACGACTT
F3 (dsrB-F3)	VAGVATSGCGATRTCAGGA
R3 (E786R)	GGACTACHVGGGTWTCTAAT
BlockR (U519R-block10)	TTTTTTTTTTGWATTACCGCGGCKGCTG/3SpC3/
BlockF (U519F-block10)	TTTTTTTTTTCAGCMGCCGCGTAATWC/3SpC3/

仪器设备

一、生成聚丙烯酰胺凝珠

1. 1.5 ml 台式高速离心机
2. 各种型号移液枪
3. 涡旋仪
4. 超声波清洗仪
5. 超净操作台
6. 通风橱

二、融合 PCR

1. 超净操作台
2. 涡旋仪
3. PCR 仪
4. PCR 管离心仪
5. 1.5 ml 台式高速离心机

三、破乳化释放聚丙烯酰胺凝珠

1. 1.5 ml 台式高速离心机
2. 各种型号移液枪
3. 通风橱
4. 磁珠清洗磁力架
5. 超净工作台

四、破乳化释放聚丙烯酰胺凝珠

1. PCR 仪
2. qPCR 仪
3. 超净操作台
4. 各种型号移液枪
5. PCR 管离心仪

实验步骤

一、生成聚丙烯酰胺凝珠

1. 细胞悬浮液准备

通过 ATP 等方法对样品细胞悬浮液的浓度进行定量检测，稀释得到 30 μl 包含 1,400 万个细胞的样品悬浮液。

2. 制备聚丙烯酰胺凝珠

2.1 混合 30 μl 细胞悬浮液 (1,400 万个细胞)、200 μl 丙烯酰胺溶液 (12% 丙烯酰胺和 0.32% BAC) 和 25 μl 过硫酸铵溶液 (10%)，轻轻涡旋混匀。

2.2 在 2 ml 圆底离心管中，加入 STT 乳化油 600 μl ，然后加入 2.1 混合所得的水性悬液 (体积 255 μl)，3,000 rpm 涡旋 30 s，产生约 5 亿个液滴 (按照液滴平均直径 10 μm 计算)。

注：STT 乳化油由司盘 80、吐温 80、聚乙二醇单辛基苯基醚和矿物油配置完成后 14 天内可用，每次使用前需要颠倒混匀。

2.3 加入四甲基乙二胺 (TEMED) 25 μl ，催化聚合反应，3,000 rpm 涡旋 30 s。

2.4 乳化液静置 90 min 聚合，生成如图 1 所示的聚丙烯酰胺凝珠。

3. 二乙醚提取聚丙烯酰胺凝珠

3.1 在 2.4 乳化液中加入水饱和二乙醚 800 μl ，立即轻弹颠倒混匀，形成可见沉淀；用移液枪移走乳化油和乙醚的混合物，添加 1 ml 超纯水，颠倒离心管混匀。

3.2 将所有样品转移至新离心管中，离心 12,000 $\times g$ 30 s，形成上层油层、中间水油混合层和下层聚丙烯酰胺凝珠。

3.3 采用移液枪移取上层油层后，加入超纯水洗涤，颠倒混匀，继续用移液枪移取油层；重复加入超纯水洗涤至不再有油层形成 (约 5 次)；在最后一次水洗不再形成油层时，采用移液枪移取上层水。

3.4 注入 1 ml 1x TK 缓冲液，重悬浮珠子于缓冲液中；用 35 μm 细胞过滤器过滤，转移到 1.5 ml 离心管中，过滤完成的聚丙烯酰胺凝珠保存于 4 $^{\circ}\text{C}$ 。

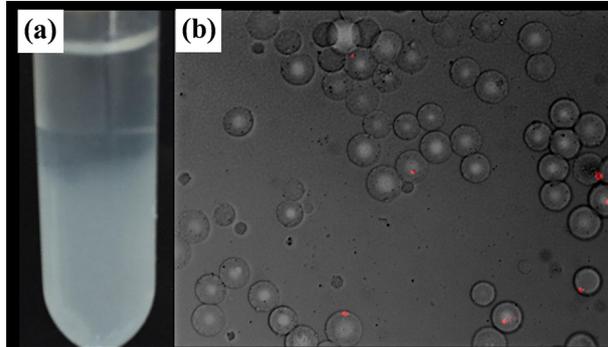


图 1. (a) 下层白色胶质物为生成的包裹细胞的聚丙烯酰胺凝珠；(b) 荧光显微镜下聚丙烯酰胺凝珠及其中包裹的单细胞微生物

4. 细胞溶解 (可选)

添加 0.8% 的溶菌酶 (35,000 U/ μl)，于 37 $^{\circ}\text{C}$ 过夜培养。离心，移除上清；重悬浮在 1x TK 缓冲液中。用 20% 蛋白酶 K (1 mg/ml) 和 0.8% TritonX-100 处理，37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 30 min，然后 95 $^{\circ}\text{C}$ 培养 10 min，重悬浮在 1x TK 缓冲液中。

二、融合 PCR

1. 配制 PCR 反应混合体系，各组分的体积为 1.1 倍样品数。

试剂	体积
无菌水	1 μl
5x Phusion HF 缓冲液	20 μl
50 mM MgCl_2	2 μl
10 mM dNTPs	2.5 μl
正向引物 F1 (10 μM)	10 μl
反向引物 R2 (10 μM)	10 μl
融合引物 R1-F2 (1 μM)	1 μl
BSA	0.5 μl
吐温-20	0.2 μl
Phusion Hot Start Flex	8 μl

2. 每个样各分装 55.2 μl 混合液到 2 ml 离心管中, 加入 45 μl 合成的聚丙烯酰胺凝珠, 混合均匀。加入 900 μl ABIL 油, 3,000 rpm 涡旋 1 min, 充分振荡混匀。
3. 分装 60 μl 反应混合液到 PCR 小管中, 每个样约分装 16 管。然后进行 PCR: 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, [94 $^{\circ}\text{C}$ 5 s, 52 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s] 33 个循环, 72 $^{\circ}\text{C}$ 5 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ ∞ 。
4. 反应结束后, 立马将融合产物收集到 1.5 ml 离心管中 (将融合产物跑电泳, 通常看不到任何产物条带, 如图 2 所示)。在每个收集的样品中, 加入终浓度为 1 mM 的 EDTA, 该样品可在 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存过夜。

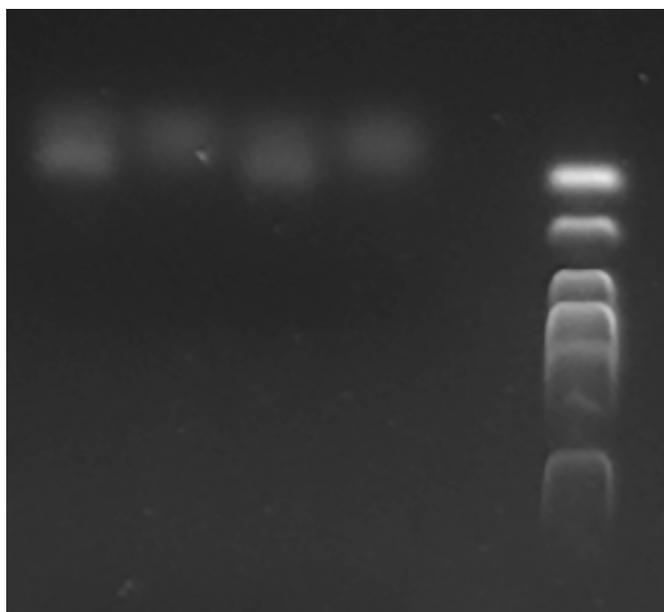


图 2. 融合 PCR 后产物跑胶图

三、破乳化释放聚丙烯酰胺凝珠

1. 破坏 ABIL 乳化体系, 释放凝珠

- 1.1 将阶段二生成的融合 PCR 产物在常温下 13,000 $\times g$ 离心 5 min, 弃上层油相。
- 1.2 加入 1 ml 水饱和二乙醚至每个样品中, (同体积水-乙醚混合液, 混匀过程中轻起瓶盖放气), 轻轻涡旋混合, 13,000 $\times g$ 离心 1 min, 弃上层液相, 重复该步骤一次。
- 1.3 同样的方法, 用水饱和乙酸乙酯清洗 2 次。

1.4 放在通风橱中吹 10 min，使残留的二乙醚尽可能挥发干净，约收集 100-150 μ l 产物。该产物可在 4 $^{\circ}$ C 保存数小时，在 -20 $^{\circ}$ C 保存过夜。

2. 磁珠清洗 PCR 产物

2.1 将磁珠充分摇匀，至于室温中平衡至室温 (10 min 左右即可，最多 30 min 足够)，每 100 μ l DNA 样品中加入 85.5 μ l 磁珠于 1.5 ml 离心管中，轻轻混匀，在室温中孵育 13 min，使 DNA 充分结合到磁珠上。

2.2 将离心管置于磁铁上，分离磁珠 2 min，移除悬液 (不要将离心管取下)。

2.3 用 0.5 ml 70%乙醇清洗磁珠 2 次 (不要将离心管取下)。

2.4 离心管保留在磁铁上，打开离心管盖子，风干 15-30 min，直至管壁上没有液滴，磁珠表面干燥。

2.5 将离心管从磁铁上取下，加入 40 μ l 的缓冲液或无菌水，轻轻混匀，室温中孵育 7 min。

2.6 将离心管置于磁铁上 2 min，收集 35-40 μ l 悬液，保存在 1.5 ml 离心管中。

四、巢式 PCR

1. 巢式 qPCR (可选)

1.1 配制反应混合液，各组分的体积为 1.1 倍样品数

试剂	体积
无菌水	7.125 μ l
5x Phusion HF 缓冲液	5 μ l
10 mM dNTPs	0.5 μ l
正向引物 F3 (10 μ M)	10 μ l
反向引物 R3 (10 μ M)	10 μ l
BlockF (32 μ M)	2.5 μ l
BlockR (32 μ M)	2.5 μ l
Phusion Hot Start Flex	0.25 μ l
100 \times SYBR Green I	0.125 μ l

1.2 每个样分装 23 μ l 混合液至 PCR 小管中，加入 2 μ l 纯化的融合 PCR 产物以及水 (作为阴性对照)。

1.3 轻弹反应液使混匀，将 PCR 管置于 PCR 管离心仪上离心片刻。进行 PCR 过程：98 °C 30 s, [98 °C 5 s, 52 °C 30 s, 72 °C 30 s] 40 个循环, 72 °C 5 min, 4 °C ∞。

1.4 根据 qPCR Ct 值评估不同样本的最少循环数，可通过稀释高浓度样本，使不同样本的循环数一样。该 PCR 产物可在 4 °C 保存数小时或者 -20 °C 过夜保存。

2. 巢式 PCR

2.1 配制反应混合液，各组分的体积为 4× 1.1 倍样品数

试剂	体积
5x Phusion HF 缓冲液	5 μl
10 mM dNTPs	0.5 μl
正向引物 F3 (3 μM)	2.5 μl
反向引物 R3 (3 μM)	2.5 μl
BlockF (32 μM)	2.5 μl
BlockR (32 μM)	2.5 μl
Phusion Hot Start Flex	0.25 μl

2.2 每个样分装 63 μl 混合液至 PCR 小管中，加入 37 μl 纯化的融合 PCR 产物 (根据 qPCR 结果进行稀释)，轻轻混匀，然后以 25 μl 体积进行分装。

2.3 进行 PCR 过程：PCR: 98 °C 30 s, [98 °C 5 s, 52 °C 30 s, 72 °C 30 s] 40 个循环 (循环数根据 qPCR 结果确定), 72 °C 5 min, 4 °C ∞。

3. 将同一样品的平行样收集到 1.5 ml 离心管中，可以先用 5 μl 样品跑水平凝胶电泳，观察生成目标产物情况。若生成目标产物，将样品跑胶然后割胶纯化，再用磁珠清洗 (方法同阶段三步骤 2)，最后送测序。

结果与分析

本课题组采用细胞内融合基因技术 (epicPCR) 对采集自十个西藏盐湖底泥的硫酸盐还原菌群落的系统分类和多样性进行了鉴定，并对影响该群落结构的环境因子进行了鉴别。研究发现了十个新的硫酸盐还原菌门，并由此表明，环境中尚有大量的未知硫酸盐还原菌群类别。可参见如下结果：

1. 通过对融合的 16S rRNA 加 *dsrB* 基因的 16S rRNA 扩增子和 epicPCR 产物的测序，共检测到 10 个湖泊的微生物总群落的 12,519 个 OTU 和硫酸盐还原菌群的 883 个 SRP OTUs (表 2)。在微生物总群落和硫酸盐还原菌类群中，变形杆菌、厚壁菌和拟杆菌是最主要的门，包括了最大比例的 OTUs 代表 (图 3)。整个微生物群落和 SRP 亚群落的 α -多样性呈显著正相关 ($R^2 = 0.443$, $P < 0.05$)， β -多样性部分重叠 (图 4)，揭示了两者的关系。

表 2. 对西藏盐湖中微生物总群落和硫酸盐还原菌群落的门，属，以及 OTUs 水平的结构比较

	Microbial community	SRP sub-community	high abundant SRP (>1% in at least one sample)
OTUs	12,519	883	120
Genus	890+ unclassified	230+ unclassified	60 + unclassified
Phylum	42 + unclassified	30 + unclassified	17 + unclassified

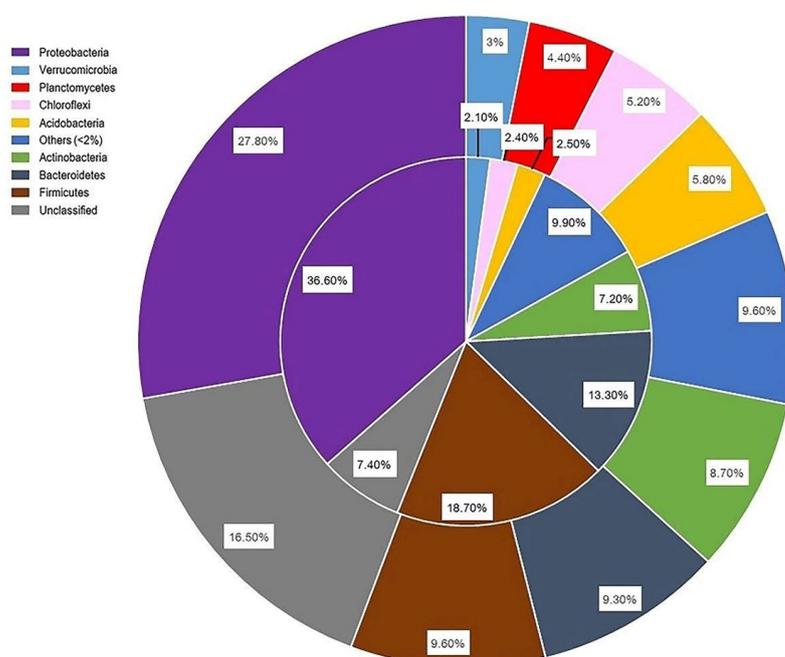


图 3. 微生物总群落和硫酸盐还原菌群落的 OTUs 的门的水平分类。外饼为微生物总群落，内饼为硫酸盐还原菌群落。

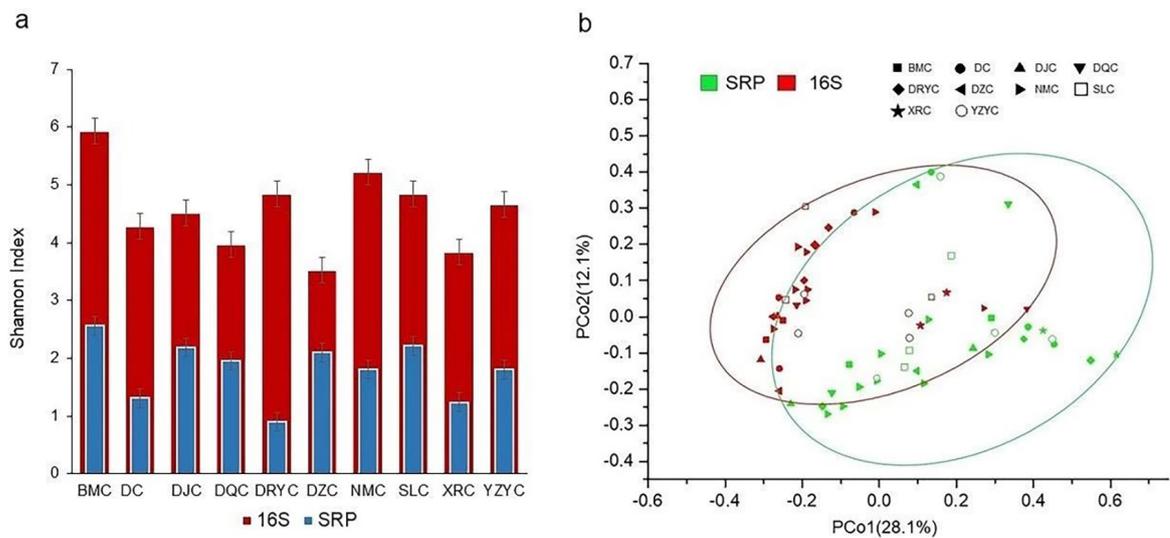


图 4. 微生物总群落和硫酸盐还原菌的 α -多样性 (a) 与 β -多样性 (b) 的对比

- 按照 epicPCR 最初创始文章的方法，筛选出了 120 个高丰度的 SRP-OTU (至少一个样本中为 1%)，并对其构建了进化树以观察进化分化 (图 5)。这些高丰度的 SRP-OTU 与 17 个描述的门相关，其中只有 7 个广为认可的 SRP 门。类似于微生物总群落的大多数 OTUs，大多数 SRP-OTUs 只存在于某个特定的湖泊中，证明了在西藏盐湖中微生物群落和 SRP 亚群落的分布的地方特殊性。

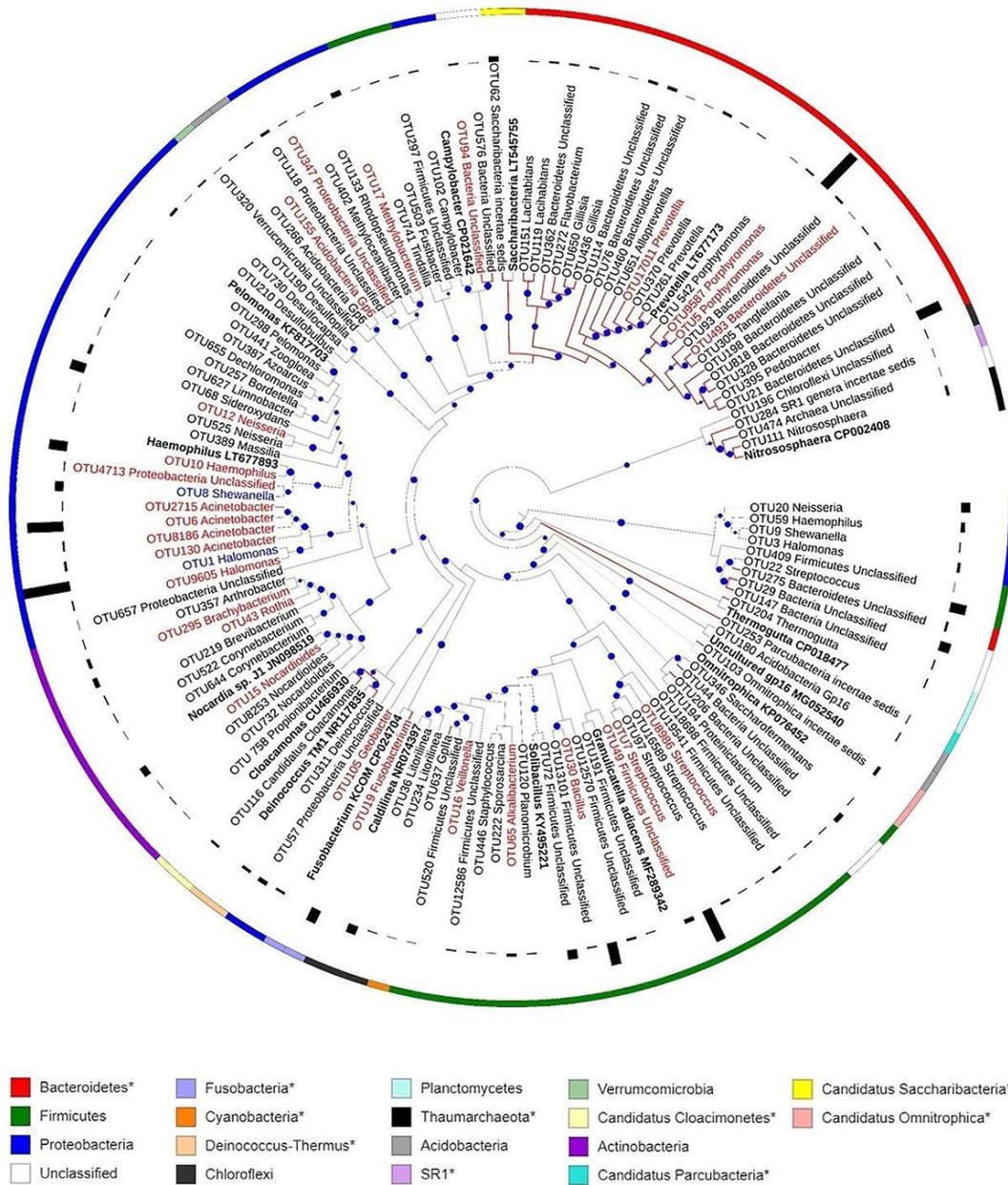


图 5. 120 个高丰度的硫酸盐还原菌的 OTUs 的进化关系。加黑字体为参考序列，蓝色字体为广泛分布的 OTUs (每一个湖中均有高丰度存在)，黑色字体为只以高丰度存在于某一个湖中的 OTUs，红色字体为高丰度存在于两个以上的湖，但并不在每个湖中都有的 OTUs。进化枝上蓝色圆形大小表示自展值的大小 (70-100)。红色进化枝代表属于新发现的十个硫酸盐还原菌门的 OTUs (图下方 * 标记的菌门)。黑色柱形代表该 OTUs 相对丰度最高的湖中的丰度。彩色条形标记门的水平的分类。

溶液配方

1. 丙烯酰胺溶液
12% 丙烯酰胺
0.32% BAC
2. 1x TK 缓冲液
20 mM Tris HCl
60 mM KCl
3. STT 乳化油 (14 天内可用, 每次使用前需要颠倒混匀)
4.5% 司盘 80
0.4% 吐温 80
0.05% Triton X-100
v/v 溶于矿物油中
4. ABIL 乳化油 (常温储存)
4% ABIL EM90
0.05% Triton X-100
v/v 溶于矿物油中

致谢

感谢自然科学基金重大研究计划培育项目 (项目号 91851106) 以及国家自然科学基金青年基金项目 (项目号 32001092) 的经费支持!感谢 MIT 研究团队 Spencer 等人, 该实验方案参考自 Spencer 等人于 2016 年发表在 ISME Journl 上的文章以及他们提供的详细的实验流程, 在此表示特别感谢!

参考文献

1. Spencer S J, Tamminen M V, Preheim S P, Guo M T, Briggs A W, Brito I L, D A W, Pitkanen L K, Vigneault F, Juhani Virta M P, Alm E J. (2016). [Massively parallel sequencing of single cells by epicPCR links functional genes with phylogenetic markers](#). *ISME J*, 10: 427-436.
2. Qin H, Wang S, Feng K, He Z, Virta M P J, Hou W, Dong H, Deng Y. (2019). [Unraveling the diversity of sedimentary sulfate-reducing prokaryotes \(SRP\)](#)

[across Tibetan saline lakes using epicPCR.](#) *Microbiome*, 7: 71.