

一种高效、低成本、可扩展的合成菌群构建方法

An Efficient, Low-cost and Scalable Method for Constructing a Thousand of Synthetic Communities (SynComs)

田箐韵¹, 师鑫¹, 李自泉¹, 陈钧婷¹, 胡雅涵¹, 吕达², 吴书凤³, 张志鹏³, 吴尘聊¹, 何佳琪¹, 万艳红¹, 陈彦昭¹, 蔡鹏¹, 徐志辉⁴, 高春辉^{1,*}

¹华中农业大学资源与环境学院, 微生物资源发掘利用全国重点实验室, 武汉, 中国

²中国科学院生态环境研究中心, 北京, 中国

³北京世纪阿姆斯生物工程有限公司, 北京, 中国

⁴南京农业大学资源与环境学院, 北京, 中国

*通讯作者: gaoch@mail.hzau.edu.cn

摘要

近年来,随着对复杂微生物群落结构和功能研究的不断深入,大规模地构建并应用合成菌群(SynComs)已经逐渐成为开展农业、医药、生态、环境、能源等领域相关微生物组功能和微生物生态学研究的基本需求。然而,理论上合成菌群的配伍组合数量随着菌群数量的增加呈指数级增长(包含N个菌株的合成菌群体系中不同组合的数量为 2^N 个),例如包含10株菌株的合成菌群体系的组合数为1024个。受限于此,既往研究通常情况下仅包含了少数一些合成菌群,而未能穷尽所有可能的组合数,某些情况下会影响对菌群涌现性功能产生机制的研究结论。为了能够实现多个物种穷尽式构建合成菌群的目标,本文将排列组合方法与微孔板、移液器等实验室常用的实验材料相结合,并开发了计算机程序完成菌群唯一编码、数据采集表格初始化等工作,从而简化了在实验室人工构建超过1,000个不同合成菌群的流程。与常规操作方法相比,该方法具有高效、低成本、可扩展的特点,并且避免了常规方法加样过程中可能出现的加样流程混乱的难题。本文以4-11个物种构建16-2048个不同的合成菌群为例,详细说明了实验操作流程。此外,方法的计算机程序以syncons软件的方式提供,这个R语言软件包可以运行在本地或者通过云服务来访问,提供加样流程查询、合成菌群编码和数据采集表格初始化等功能。考虑到合成菌群在研究中的巨大潜力,该合成菌群构建方法可作为微生物共培养、多物种生物膜等研究领域中的一项目基本实验操作,具有广泛的应用价值。

关键词: 合成菌群, 涌现性特征, 共培养, 多物种生物膜, 菌群构建

引用格式: 田箐韵, 师鑫, 李自泉, 陈钧婷, 胡雅涵, 吕达, 吴书凤, 张志鹏, 吴尘聊, 何佳琪, 万艳红, 陈彦昭, 蔡鹏, 徐志辉, 高春辉. (2024). 一种高效、低成本、可扩展的合成菌群构建方法. *Bio-101* e2405401. Doi: 10.21769/BioProtoc.2405401.

How to cite: Tian, Q. Y., Shi, X., Li, Z. X., Chen, J. T., Hu, Y. H., Lv, D., Wu, S. F., Zhang, Z. P., Wu, C. L., He, J. Q., Wan, Y. H., Chen, Y. Z., Cai, P., Xu, Z. H. and Gao, C. H. (2024). An Efficient, Low-cost and Scalable Method for Constructing a Thousand of Synthetic Communities (SynComs). *Bio-101* e2405401. Doi: 10.21769/BioProtoc.2405401. (in Chinese)

Copyright: © 2024 The Authors; exclusive licensee Bio-protocol LLC.

研究背景

近年来，随着对复杂微生物群落结构和功能研究的不断深入，构建并应用合成菌群（SynComs [1]）已经逐渐成为开展农业 [2]、医药 [3]、生态 [4]、环境 [5]、能源 [6]等领域相关微生物组功能和微生物生态学研究的基本需求。未来，采用“自下而上”的方法开展设计合成菌群的研究，将会扩展到包含数十甚至数百种菌株的复杂菌群 [7]。理论上，合成菌群的配伍组合数量随着菌群数量的增加呈指数级增长（包含 N 个菌株的合成菌群体系中不同组合的数量为 2^N 个），例如包含 10 株菌株的合成菌群的组合数为 1024 个。受限于此，既往研究通常未能覆盖所有可能的组合数，而是仅涉及其中少数合成菌群组合，这可能会影响我们对菌群涌现性功能和产生机制的理解。为了满足特定的研究需要，有时有必要穷尽式的构建所有可能的合成菌群组合。

目前，构建大量合成菌群的工作主要采用人工、自动化设备、微液滴技术等方法完成。其中自动化设备，比如 apricot DC1 移液工作站，虽然一定程度上实现了高重复性和高精度度，但是牺牲了一些机动性，并且仪器以及耗材的成本非一般实验室可以承担。另外，虽然微液滴技术在高通量筛选合成菌群的研究中显示出巨大的潜力，但是当前其应用受到诸多技术障碍的限制 [8]。按照传统的构建思路，人工无疑是效率最低且失误差最大的方法，然而，本方法通过对加样顺序的合理规划能够显著提高人工构建合成菌群的效率，同时显著降低失误差，为相关领域研究者们提供一种方便实用的实验策略。

原理与方法

合成菌群是人工构建的简单微生物群落，通常含有的物种数目在 3 - 7 个之间。为了能够穷尽式构建 n 个物种所有可能的物种组合，需要考虑包含 0 个物种、1 个物种、双物种、多物种，以及 n 个物种的情况。以 $n=10$ 为例，根据排列公式可知全部的物种组合数目 N 可以通过以下公式计算得到（公式 1）：

$$N = C_{10}^0 + C_{10}^1 + C_{10}^2 + \cdots + C_{10}^9 + C_{10}^{10} = \sum_{k=0}^n \binom{10}{k} \quad (\text{公式 1})$$

如图 1 所示，这个穷尽式构建方案中，不含任何物种（无菌）的组合数目为 1 个，单一物种组合数为 10 个，双物种组合数为 45 个，三物种组合数为 120 个等。全部的组合数为 1,024 个。无菌、单菌等组合虽然不能称为传统意义上的菌群，但是对于研究来说是必不可少的对照，因此也属于这一合成菌群体系的重要成员。

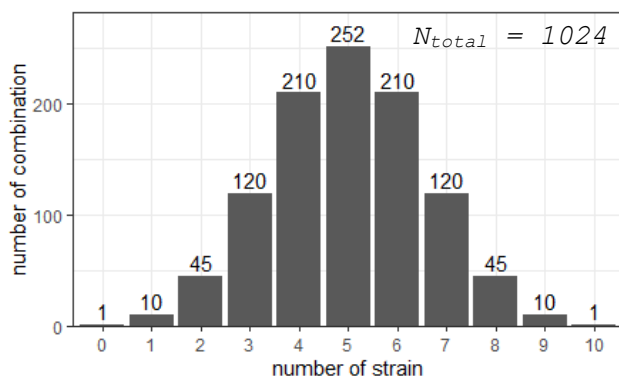


图 1. 以 10 个菌株为例，穷尽式构建合成菌群时含有不同物种数目的合成菌群的组合数目。

引用格式：田箐韵，师鑫，李自泉，陈钧婷，胡雅涵，吕达，吴书凤，张志鹏，吴尘聊，何佳琪，万艳红，陈彦昭，蔡鹏，徐志辉，高春辉. (2024). 一种高效、低成本、可扩展的合成菌群构建方法. *Bio-101* e2405401.

Doi: 10.21769/BioProtoc.2405401.

How to cite: Tian, Q. Y., Shi, X., Li, Z. X., Chen, J. T., Hu, Y. H., Lv, D., Wu, S. F., Zhang, Z. P., Wu, C. L., He, J. Q., Wan, Y. H., Chen, Y. Z., Cai, P., Xu, Z. H. and Gao, C. H. (2024). An Efficient, Low-cost and Scalable Method for Constructing a Thousand of Synthetic Communities (SynComs). *Bio-101* e2405401. Doi: 10.21769/BioProtoc.2405401. (in Chinese)

推广开来，若设 n 个菌株构建得到的全部可能合成菌群组合数目为 N ，则由二项式定律，可推得该数目的值等于 2 的 n 次方（公式 2）。因此，合成菌群的组合数目会随着菌株数目的增加指数增加。鉴于此，如果采用人工操作的方法，在短时间内构建数十个不同的合成菌群可能比较容易，但是随着物种数目增加，当需要处理上百种不同的组合时，如果没有合理的设计，那么将非常容易出错。

$$N = \sum_{k=0}^n \binom{n}{k} = 2^n \quad (\text{公式 2})$$

从组合数学的角度来看， 2^n 代表了从 n 个元素中选取子集的所有可能方式的总数。每个子集对应一个 0-1 向量，其中 0 表示不包含某元素，1 表示包含某元素。因此，当我们将这些向量进行排序后，它们可以有序的排列在 $2^{n-1} \times 2^{n-1}$ 布局的二维平面上。这就为我们合理规划构建合成菌群过程中的加样顺序提供了重要指引。

由于实验室中并没有 $2^{n-1} \times 2^{n-1}$ 的微孔板，而常见的微孔板只有 24 孔、96 孔和 384 孔等规格，所以实验操作以行和列为单位在 24 孔板、96 孔板、384 孔板提供的加样空间上有序开展。每个合成菌群的组合都依据所处的孔板和在孔板中的位置给出唯一编码。最终，该方法能够在短时间内构建超过一千个不同的合成菌群组合。在后两种微孔板上构建合成菌群的时候，通过使用多通道移液器进行操作，可以大幅提高工作效率。为了能够明确加样完成后每个孔位中所包含合成菌群的菌株组成，我们还开发了一个 R 语言软件包 `syncons`。该软件包可以运行在本地或者通过云服务来访问，除了提供合成菌群编码信息，还有加样流程查询和数据采集表格初始化等功能。

总的来说，本方法旨在利用实验室常见的材料与仪器，通过对加样顺序的合理规划提高了人工构建合成菌群的效率，同时还可以减少失误、避免交叉污染，为相关领域研究者们提供一种方便实用的实验策略。

材料与试剂

1. 菌株

不同菌株以代号区分，本文中分别表示为菌株 S1、菌株 S2、菌株 S3、菌株 S4、菌株 S5、菌株 S6、菌株 S7、菌株 S8、菌株 S9、菌株 S10、菌株 S11，一共有 11 个不同的细菌菌株。

- 24 孔板 (Corning, catalog number: 3524)
- 96 孔板 (Corning, catalog number: 3599)
- 384 孔板 (Axygen®, catalog number: P-384-240SQ-C-S)
- 移液器吸头 (Biosharp, catalog number: BS-200-T)
- 加样槽 (Biosharp, catalog number: BS-PS50-RR)
- 培养基 (BD, catalog number: GD-211825)

仪器设备

- 摇床 (华美生化仪器, catalog number: THZ-701B)
- 单通道移液器 (Thermo Scientific™, catalog number: 4651140N)
- 8 通道移液器 (Thermo Scientific™, catalog number: 4661010N)
- 16 通道移液器 (EVOLVE, catalog number: 3044)
- 超净工作台 (苏净安泰 AIRTECH, catalog number: ES-A01-VS-1300L-U)

引用格式：田箐韵，师鑫，李自泉，陈钧婷，胡雅涵，吕达，吴书凤，张志鹏，吴尘聊，何佳琪，万艳红，陈彦昭，蔡鹏，徐志辉，高春辉. (2024). 一种高效、低成本、可扩展的合成菌群构建方法. *Bio-101* e2405401.

Doi: 10.21769/BioProtoc.2405401.

How to cite: Tian, Q. Y., Shi, X., Li, Z. X., Chen, J. T., Hu, Y. H., Lv, D., Wu, S. F., Zhang, Z. P., Wu, C. L., He, J. Q., Wan, Y. H., Chen, Y. Z., Cai, P., Xu, Z. H. and Gao, C. H. (2024). An Efficient, Low-cost and Scalable Method for Constructing a Thousand of Synthetic Communities (SynComs). *Bio-101* e2405401. Doi: 10.21769/BioProtoc.2405401. (in Chinese)

实验步骤

- (一) 将准备好的菌液分别注入加样槽；
- (二) 按照图示步骤，使用相应移液器进行加样。其中 96 孔板体系可以使用 8 通道移液器，384 孔板体系可以使用 16 通道移液器。所有加样操作在超净工作台中进行。

方法 M1. 配伍包含 4 株菌株（共 16 个组合）的合成菌群体系

操作步骤如下（图 2）：

1. 取 1 个 24 孔板，加样使用第 1–4 行的第 1–4 列，共有 16 个孔位；
2. 在第 1–2 列中加入菌株 S1；
3. 在第 1 列、第 3 列中加入菌株 S2；
4. 在第 1–2 行中的前 4 列中加入菌株 S3；
5. 在第 1 行、第 3 行中的前 4 列中加入菌株 S4。
6. 加样完成后，各个孔中包含的合成菌群结构如表格 1 所示。所得的合成菌群体系包括无菌对照一个（D4 孔），1 菌株体系 4 个（B4、C4、D2 和 D3 孔），2 菌株合成菌群 6 个（A4、B2、B3、C2、C3 和 D1 孔），3 菌株合成菌群 4 个（A2、A3、B1 和 C1 孔），4 菌株合成菌群 1 个（A1 孔），合计 16 个。（表 1）

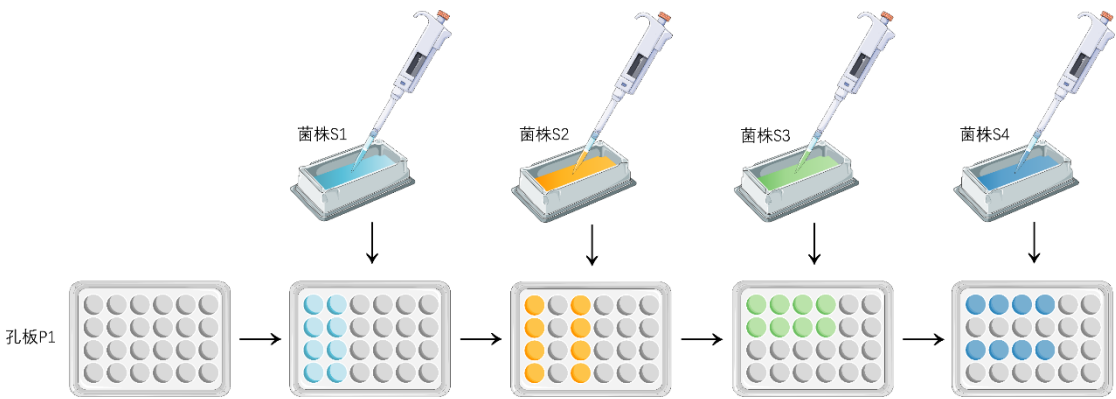


图 2. 利用 24 孔板构建包含 4 株菌株的合成菌群体系的操作流程。每个孔对应的合成菌群组成详见附件 Sheet 1。

表 1. 使用 4 菌株构建 16 个结构不同的合成菌群

行/列	1	2	3	4
A	S1/S2/S3/S4	S1/S3/S4	S2/S3/S4	S3/S4
B	S1/S2/S3	S1/S3	S2/S3	S3
C	S1/S2/S4	S1/S4	S2/S4	S4
D	S1/S2	S1	S2	对照

方法 M2. 配伍包含 5 株菌株（共 32 个组合）的合成菌群体系

操作步骤如下（图 3）：

1. 取 1 个 24 孔板 P1，按照方法 M1 构建 16 个合成菌群；
2. 取另 1 个 24 孔板 P2，在前 4 列加入菌株 S5，然后按照方法 M1 进行操作，构建 16 个合成菌群。
3. 一共得到包含 5 个菌株 S1-S5 的合成菌群 32 个，其编号和包含的菌株详见附件 Sheet2。

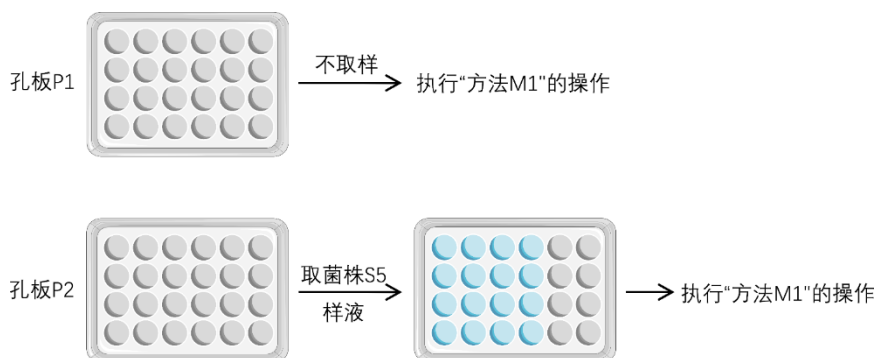


图3 利用 24 孔板构建包含 5 株菌株的合成菌群体系的操作流程，其中“方法 M1”详见图 1。每个孔对应的合成菌群组成详见附件 Sheet 2。

方法 M3. 配伍包含 6 株菌株（共 64 个组合）的合成菌群体系

操作步骤如下（图 4）：

1. 取 1 个 96 孔板，加样使用第 1–8 行的第 1–8 列，共有 64 个孔位；
2. 在第 1–4 列中加入菌株 S1；
3. 在第 1–2 列和第 5–6 列中加入菌株 S2；
4. 在第 1 列、第 3 列、第 5 列、第 7 列中加入菌株 S3；
5. 在第 1–4 行中的前 8 列中加入菌株 S4；
6. 在第 1–2 行、第 5–6 行的前 8 列中加入菌株 S5；
7. 在第 1 行、第 3 行、第 5 行、第 7 行的前 8 列中加入菌株 S6；
8. 一共得到包含 6 个菌株 S1–S6 的合成菌群 64 个，在 96 孔板中的分布情况见表 2，各个合成菌群的编号和包含的菌株详见附件 Sheet 3。

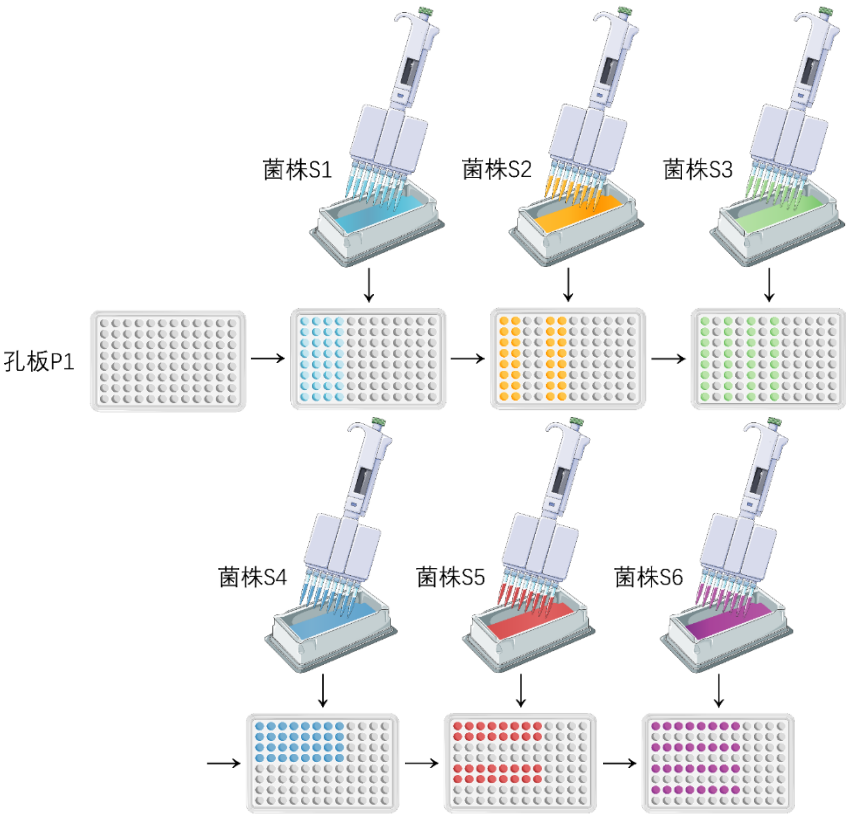


图 4. 利用 96 孔板和 8 通道移液器构建包含 6 株菌株的合成菌群体系的操作流程。每个孔对应的合成菌群组成详见附件 Sheet 3。

表 2. 使用 6 个菌株构建的 64 个合成菌群在 96 孔板中的分布情况。数据采集表格见附件 Sheet 3

	1	2	3	4	5	6	7	8
A	S1/S2/S3/S4/S5/S6	S1/S2/S4/S5/S6	S1/S3/S4/S5/S6	S1/S4/S5/S6	S2/S3/S4/S5/S6	S2/S4/S5/S6	S3/S4/S5/S6	S4/S5/S6
B	S1/S2/S3/S4/S5	S1/S2/S4/S5	S1/S3/S4/S5	S1/S4/S5	S2/S3/S4/S5	S2/S4/S5	S3/S4/S5	S4/S5
C	S1/S2/S3/S4/S6	S1/S2/S4/S6	S1/S3/S4/S6	S1/S4/S6	S2/S3/S4/S6	S2/S4/S6	S3/S4/S6	S4/S6
D	S1/S2/S3/S4	S1/S2/S4	S1/S3/S4	S1/S4	S2/S3/S4	S2/S4	S3/S4	S4
E	S1/S2/S3/S5/S6	S1/S2/S5/S6	S1/S3/S5/S6	S1/S5/S6	S2/S3/S5/S6	S2/S5/S6	S3/S5/S6	S5/S6
F	S1/S2/S3/S5	S1/S2/S5	S1/S3/S5	S1/S5	S2/S3/S5	S2/S5	S3/S5	S5
G	S1/S2/S3/S6	S1/S2/S6	S1/S3/S6	S1/S6	S2/S3/S6	S2/S6	S3/S6	S6
H	S1/S2/S3	S1/S2	S1/S3	S1	S2/S3	S2	S3	空白

方法 M4. 配伍包含 7 株菌株（共 128 个组合）的合成菌群体系

操作步骤如下（图 5）：

1. 取 1 个 96 孔板 P1，按照方法 M3 构建 64 个合成菌群；
2. 取另 1 个 96 孔板 P2，在前 8 列加入菌株 S7，然后按照方法 M3 进行操作，构建 64 个合成菌群。
3. 一共得到包含 7 个菌株 S1-S7 的合成菌群 128 个，其编号和包含的菌株详见附件 Sheet 4。

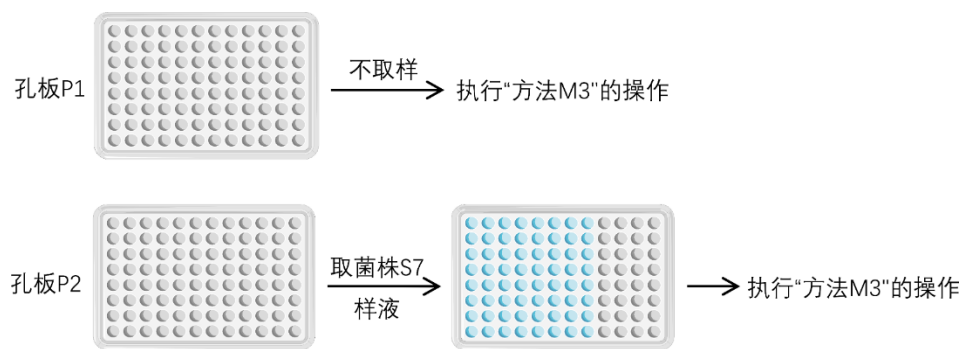


图 5. 利用 96 孔板和 8 通道移液器构建包含 7 株菌株的合成菌群体系的操作流程，其中“方法 M3”详见图 4。每个孔对应的合成菌群组成详见附件 Sheet 4。

方法 M5. 配伍包含 8 株菌株（共 256 个组合）的合成菌群体系

此方法可以在 4 块 96 孔板（见方案 Plan A）或者 1 块 384 孔板中（见方案 Plan B）进行。

（方案 Plan A）

操作步骤如下（图 6）：

1. 取第 1 个 96 孔板 P1，按照方法 M3 构建 64 个合成菌群；
2. 取第 2 个 96 孔板 P2，在前 8 列加入菌株 S7，然后按照方法 M3 进行操作，构建 64 个合成菌群。
3. 取第 3 个 96 孔板 P3，在前 8 列加入菌株 S8，然后按照方法 M3 进行操作，构建 64 个合成菌群。
4. 取第 4 个 96 孔板 P4，在前 8 列加入菌株 S7 和菌株 S8，然后按照方法 M3 进行操作，构建 64 个合成菌群。
5. 一共得到包含 8 个菌株 S1-S8 的合成菌群 256 个，其编号和包含的菌株详见附件 Sheet 5-1。

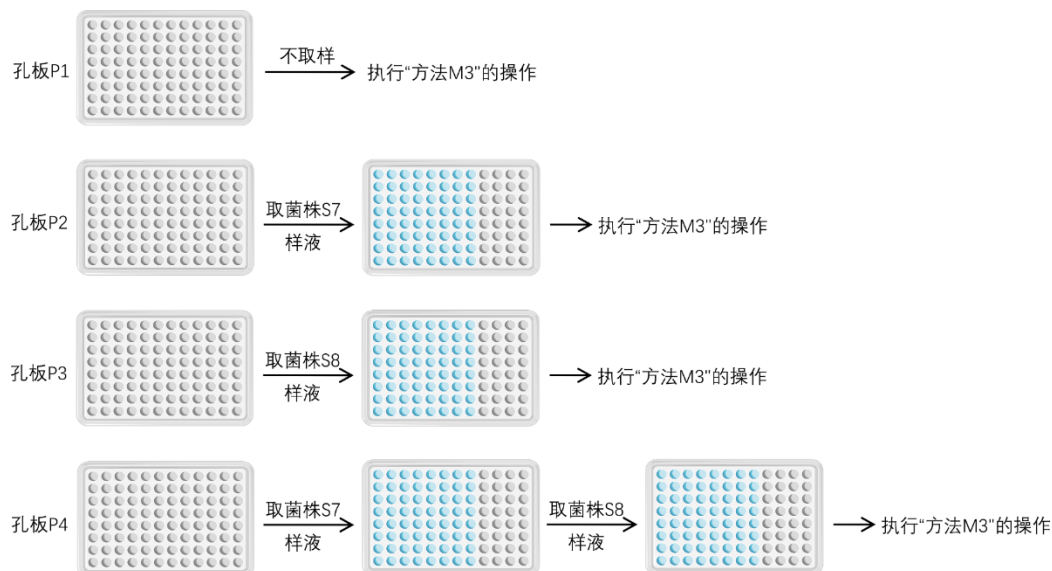


图 6. 利用 96 孔板和 8 通道移液器构建包含 8 株菌株的合成菌群体系的操作流程，其中“方法 M3”详见图 4。每个孔对应的合成菌群组成详见附件 Sheet 5-1。

（方案 Plan B）

操作步骤如下（图 7）：

1. 取 1 个 384 孔板，加样使用第 1-16 行的第 1-16 列，共有 256 个孔位；

引用格式：田箐韵，师鑫，李自泉，陈钧婷，胡雅涵，吕达，吴书凤，张志鹏，吴尘聊，何佳琪，万艳红，陈彦昭，蔡鹏，徐志辉，高春辉. (2024). 一种高效、低成本、可扩展的合成菌群构建方法. *Bio-101* e2405401.

Doi: 10.21769/BioProtoc.2405401.

How to cite: Tian, Q. Y., Shi, X., Li, Z. X., Chen, J. T., Hu, Y. H., Lv, D., Wu, S. F., Zhang, Z. P., Wu, C. L., He, J. Q., Wan, Y. H., Chen, Y. Z., Cai, P., Xu, Z. H. and Gao, C. H. (2024). An Efficient, Low-cost and Scalable Method for Constructing a Thousand of Synthetic Communities (SynComs). *Bio-101* e2405401. Doi: 10.21769/BioProtoc.2405401. (in Chinese)

2. 在第 1–8 列中加入菌株 S1;
3. 在第 1–4 列和第 9–12 列中加入菌株 S2;
4. 在第 1–2 列、第 5–6 列、第 9–10 列、第 13–14 列中加入菌株 S3;
5. 在第 1 列、第 3 列、第 5 列、第 7 列、第 9 列、第 11 列、第 13 列、第 15 列中加入菌株 S4;
6. 在第 1–8 行的前 8 列中加入菌株 S5;
7. 在第 1–4 行和第 9–12 行的前 8 列中加入菌株 S6;
8. 在第 1–2 行、第 5–6 行、第 9–10 行、第 13–14 行的前 8 列中加入菌株 S7;
9. 在第 1 行、第 3 行、第 5 行、第 7 行、第 9 行、第 11 行、第 13 行、第 15 行的前 8 列中加入菌株 S8
- ;
10. 一共得到包含 8 个菌株 S1-S8 的合成菌群 256 个, 其编号和包含的菌株详见附件 Sheet 5–2。

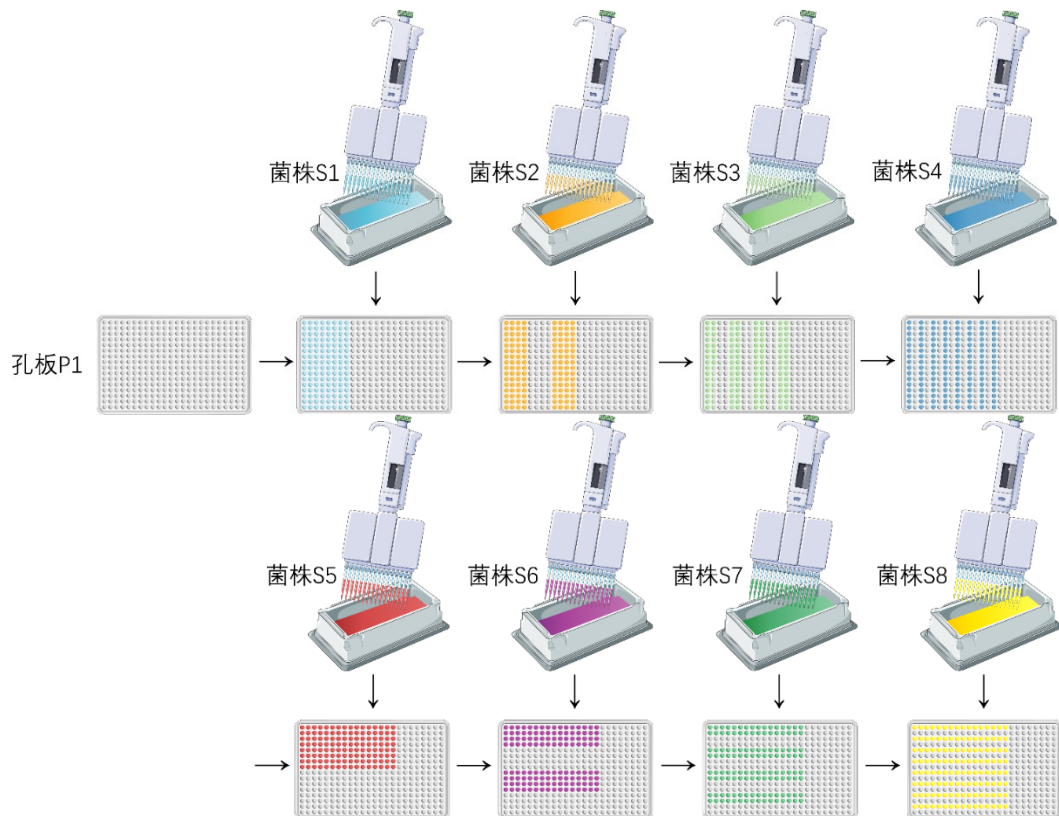


图 7. 利用 384 孔板和 16 通道移液器构建包含 8 株菌株的合成菌群体系的操作流程。每个孔对应的合成菌群组成详见附件 Sheet 5–2。

方法 M6. 配伍包含 9 株菌株 (共 512 个组合) 的合成菌群体系的方案

此方法可以在 8 块 96 孔板 (见方案 Plan A) 或者 2 块 384 孔板中 (见方案 Plan B) 进行。

(方案 Plan A)

操作步骤如下 (图 8) :

1. 取第 1 个 96 孔板 P1, 按照方法 M3 构建 64 个合成菌群;
2. 取第 2 个 96 孔板 P2, 在前 8 列加入菌株 S7, 然后按照方法 M3 进行操作, 构建 64 个合成菌群。
3. 取第 3 个 96 孔板 P3, 在前 8 列加入菌株 S8, 然后按照方法 M3 进行操作, 构建 64 个合成菌群。
4. 取第 4 个 96 孔板 P4, 在前 8 列加入菌株 S9, 然后按照方法 M3 进行操作, 构建 64 个合成菌群。
5. 取第 5 个 96 孔板 P5, 在前 8 列依次加入菌株 S7 和菌株 S8, 然后按照方法 M3 进行操作, 构建 64 个合成菌群。

引用格式: 田箐韵, 师鑫, 李自泉, 陈钧婷, 胡雅涵, 吕达, 吴书凤, 张志鹏, 吴尘聊, 何佳琪, 万艳红, 陈彦昭, 蔡鹏, 徐志辉, 高春辉. (2024). 一种高效、低成本、可扩展的合成菌群构建方法. *Bio-101* e2405401.

Doi: 10.21769/BioProtoc.2405401.

How to cite: Tian, Q. Y., Shi, X., Li, Z. X., Chen, J. T., Hu, Y. H., Lv, D., Wu, S. F., Zhang, Z. P., Wu, C. L., He, J. Q., Wan, Y. H., Chen, Y. Z., Cai, P., Xu, Z. H. and Gao, C. H. (2024). An Efficient, Low-cost and Scalable Method for Constructing a Thousand of Synthetic Communities (SynComs). *Bio-101* e2405401. Doi: 10.21769/BioProtoc.2405401. (in Chinese)

6. 取第 6 个 96 孔板 P6，在前 8 列依次加入菌株 S7 和菌株 S9，然后按照方法 M3 进行操作，构建 64 个合成菌群。
7. 取第 7 个 96 孔板 P7，在前 8 列依次加入菌株 S8 和菌株 S9，然后按照方法 M3 进行操作，构建 64 个合成菌群。
8. 取第 8 个 96 孔板 P8，在前 8 列依次加入菌株 S7、菌株 S8 和菌株 S9，然后按照方法 M3 进行操作，构建 64 个合成菌群。
9. 一共得到包含 9 个菌株 S1-S9 的合成菌群 512 个，其编号和包含的菌株详见附件 Sheet 6-1。

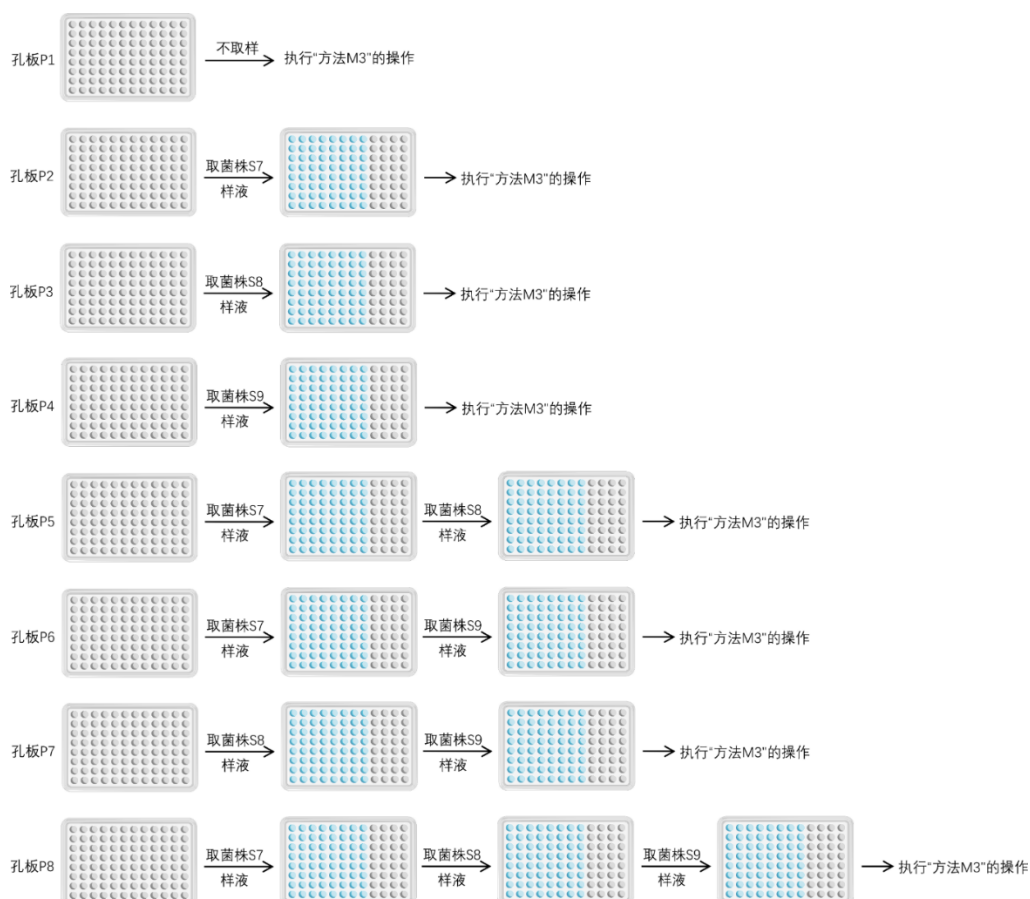


图 8. 利用 96 孔板和 16 通道移液器构建包含 9 株菌株的合成菌群体系的操作流程，其中“方法 M3”详见图 4。每个孔对应的合成菌群组成详见附件 Sheet 6-1。

(方案 Plan B)

加样方法参见方法 M4，使用 16 道移液器在 2 块 384 孔板上进行构建，此处不再赘述。每个孔对应的合成菌群组成详见附件 Sheet 6-2。

方法 M7. 配伍包含 10 株菌株（共 1,024 个组合）的合成菌群体系

加样方法参见方法 M5 方案 Plan B，使用 16 道移液器在 4 块 384 孔板上进行构建，此处不再赘述。每个孔对应的合成菌群组成详见附件 Sheet 7。

方法 M8. 配伍包含 11 株菌株（共 2,048 个组合）的合成菌群体系

加样方法参见方法 M6 的方案 A，使用 16 道移液器在 8 块 384 孔板上进行构建，此处不再赘述。每个孔对应的合成菌群组成详见附件 Sheet 8。

样品编号和菌株组成表格

本文提供的 Excel 附件中列出了所有样品的编号和菌株组成。为了生成菌株组合的附件，我们使用了一个 R 语言软件包 `syncons` (<https://github.com/gaospecial/syncons>)，这个软件可以按照合成菌群在平板上的位置编号，并列出生成菌群的组成，方便开展后续实验后采集实验数据。软件包包含一个 Shiny 应用程序（图 9），可以根据用户提供的菌株编号自动化生成样品表格。该 Shiny 应用程序也已经发布到公共云服务平台，可直接使用浏览器访问 (<https://bio-spring.shinyapps.io/SynComsConstructor/>)。

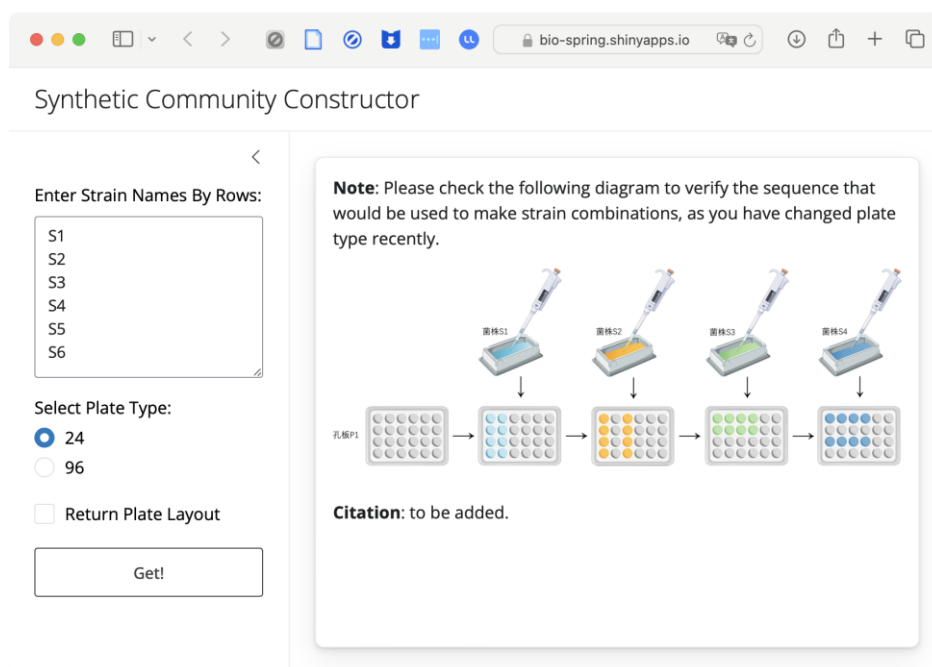


图 9. 适用于构建合成菌群样品信息表格的 Shiny 程序。 用户可以提供自己的菌株编号，并制定构建过程中使用的平板类型（如 24 孔板、96 孔板），按照方法指定的加样顺序进行混合后，所有的合成菌群 ID 和组成可以通过 Get! 按钮获取。

注意事项

为避免污染、提高效率、确保准确，加样时需要注意下列事项。

1. 为避免孔板内溶液溢出，请根据菌株数量控制每个菌株菌液的加样体积。通常 96 孔板的每孔容量在 300 μL 左右，这种情况下每个菌株的加样体积可以设为 20 – 30 μL 即可满足实验需要；384 孔板如果采用深孔的类型（如 Axygen®），每孔工作容量可以达到 240 μL ，这种情况下每个菌株的加样体积可以设为 20 μL 以满足包含 11 个菌株的 2048 个合成菌群构建。
2. 加样的时候按照图示依次取不同的菌株加入加样槽，加样完成后清理工作区后再进行下一步操作。以某个加样体系中的菌株 S1 为例，将菌株 S1 注入加样槽后，根据方案一次加完所有需要注入菌株 S1 的孔，之后再 S2 注入加样槽重复以上操作。加样菌株 S1 或 S2 的时候，不更换吸头可以加快加样速度，但是需要注意稳定移液器，避免触碰到孔板内壁，同时确保移液器与吸头的连接紧密，以确保没有交叉污染和移液量不准确。
3. 本方法中合成菌群所包含的全部菌株的初始比例均为 1:1。该初始比例为体积比。如果需要得到菌株数目的初始比例为 1:1，在不同菌株培养液中的细胞浓度有差异的情况下，可以通过加入新鲜培养基的方法进行调整。不过，根据我们前期的研究，由于群落组装时候收敛演化现象的存在，初始比例的

引用格式：田箐韵，师鑫，李自泉，陈钧婷，胡雅涵，吕达，吴书凤，张志鹏，吴尘聊，何佳琪，万艳红，陈彦昭，蔡鹏，徐志辉，高春辉. (2024). 一种高效、低成本、可扩展的合成菌群构建方法. *Bio-101* e2405401.

Doi: 10.21769/BioProtoc.2405401.

How to cite: Tian, Q. Y., Shi, X., Li, Z. X., Chen, J. T., Hu, Y. H., Lv, D., Wu, S. F., Zhang, Z. P., Wu, C. L., He, J. Q., Wan, Y. H., Chen, Y. Z., Cai, P., Xu, Z. H. and Gao, C. H. (2024). An Efficient, Low-cost and Scalable Method for Constructing a Thousand of Synthetic Communities (SynComs). *Bio-101* e2405401. Doi: 10.21769/BioProtoc.2405401. (in Chinese)

较小差异一般不会对合成菌群的功能产生显著影响 [9]。通常需要初始比例在数量级上存在差异群落的功能才会显出明显的不同 [10]。因此，体积比 1:1 可以满足绝大多数研究的需要。

4. 当某个加样体系有多个菌株、多个孔板时，务必对菌株和孔板等进行编号，并在孔板上进行编号，以避免加样时出现混淆或者遗漏的情况。在我们提供的附件中，列出了所有方法得到的合成菌群 ID 和组成。
5. 加样完毕后，在进行后续实验以前需要将孔板进行振荡混匀。如果暂时不使用，可以加上盖子密封后置于 4 °C 冰箱保存 1–3 天。理论上也可以加入甘油后置于 -20 °C 或 -80 °C 保存备用。不过，为确保重复性我们建议现配先用。
6. 本方法仅仅使用了孔板的部分区域。多余的孔可以用来设置实验对照。通常建议的对照包括培养基对照（确保培养基无污染），加样对照（确保加样过程中的实验材料无污染），额外的单菌对照（增加更多的单菌对照）等。

致谢

本研究得到了国家自然科学基金（32370127，32100090），教育部产学研合作协同育人（20222016B03）等项目资助。图片使用了 bioicons 网站（<https://bioicons.com>）的模板并使用 Inkscape 软件对其进行了改编，模板作者分别是 Servier 和 Marcel Tisch。

参考文献

1. Großkopf, T. and Soyer, O. S. (2014). Synthetic Microbial Communities. *Curr Opin Microbiol.* 18: 72–77. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2014.02.002>
2. Arif, I., Batool, M. and Schenk, P. M. (2020). Plant Microbiome Engineering: Expected Benefits for Improved Crop Growth and Resilience. *Trends Biotechnol.* 38(12): 1385–1396. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2020.04.015>
3. van Leeuwen, P. T., Brul, S., Zhang, J. and Wortel, M. T. (2023). Synthetic microbial communities (SynComs) of the human gut: design, assembly, and applications. *FEMS Microbiol Rev.* 47(2): e1093/femsre/fuad012. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuad012>
4. Gupta, S., Ross, T. D., Gomez, M. M., Grant, J. L., Romero, P. A. and Venturelli, O. S. (2020). Investigating the dynamics of microbial consortia in spatially structured environments. *Nat Commun.* 11(1): 2418. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-16200-0>
5. Chen, X., Zhou, X., Geng, P., Zeng, Y., Hu, F., Sun, P., Zhuang, G. and Ma, A. (2023). Advancing biodegradation of petroleum contaminants by indigenous microbial consortia through assembly strategy innovations. *Chem Eng J.* 475: 146142. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2023.146142>
6. Jiang, Y., Dong, W., Xin, F. and Jiang, M. (2020). Designing Synthetic Microbial Consortia for Biofuel Production. *Trends Biotechnol.* 38(8): 828–831. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2020.02.002>
7. Lawson, C. E., Harcombe, W. R., Hatzenpichler, R., Lindemann, S. R., Löffler, F. E., O'Malley, M. A., García Martín, H., Pfleger, B. F., Raskin, L., Venturelli, O. S., et al. (2019). Common principles and best practices for engineering microbiomes. *Nat Rev Microbiol.* 17(12): 725–741. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0255-9>
8. Shang, L., Cheng, Y. and Zhao, Y. (2017). Emerging Droplet Microfluidics. *Chem Rev.* 117(12): 7964–8040. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.6b00848>
9. Gao, C. H., Cao, H., Ju, F., Xiao, K. Q., Cai, P., Wu, Y. and Huang, Q. (2021). Emergent transcriptional adaption facilitates convergent succession within a synthetic community. *ISME Commun.* 1(1): 46. <https://doi.org/10.1038/s43705-021-00049-5>
10. Gao, C. H., Cao, H., Cai, P. and Sørensen, S. J. (2020). The initial inoculation ratio regulates bacterial coculture interactions and metabolic capacity. *ISME J.* 15(1): 29–40. <https://doi.org/10.1038/s41396-020-00751-7>

引用格式：田箐韵，师鑫，李自泉，陈钧婷，胡雅涵，吕达，吴书凤，张志鹏，吴尘聊，何佳琪，万艳红，陈彦昭，蔡鹏，徐志辉，高春辉. (2024). 一种高效、低成本、可扩展的合成菌群构建方法. *Bio-101* e2405401.

Doi: 10.21769/BioProtoc.2405401.

How to cite: Tian, Q. Y., Shi, X., Li, Z. X., Chen, J. T., Hu, Y. H., Lv, D., Wu, S. F., Zhang, Z. P., Wu, C. L., He, J. Q., Wan, Y. H., Chen, Y. Z., Cai, P., Xu, Z. H. and Gao, C. H. (2024). An Efficient, Low-cost and Scalable Method for Constructing a Thousand of Synthetic Communities (SynComs). *Bio-101* e2405401. Doi: 10.21769/BioProtoc.2405401. (in Chinese)

附件

以下信息可在[此处](#)下载:

1. 附件 Sheet 1
2. 附件 Sheet 2
3. 附件 Sheet 3
4. 附件 Sheet 4
5. 附件 Sheet 5
6. 附件 Sheet 6
7. 附件 Sheet 7
8. 附件 Sheet 8