

# 细菌单细胞测序技术研究进展

刘毛毛<sup>1</sup>, 陈欢<sup>2,3</sup>, 高原<sup>1</sup>, 赵蓓蓓<sup>1</sup>, 荣雅文<sup>\*1</sup>, 黄俊<sup>\*1</sup>

1 浙江科技大学 生物与化学工程学院, 浙江 杭州 310023

2 浙江中医药大学 生命科学学院, 浙江 杭州 310053

3 杭州微数生物科技有限公司, 浙江 杭州 311215

刘毛毛, 陈欢, 高原, 赵蓓蓓, 荣雅文, 黄俊. 细菌单细胞测序技术研究进展[J]. 微生物学通报, 2025, 52(1): 101-113.

LIU Maomao, CHEN Huan, GAO Yuan, ZHAO Beibei, RONG Yawen, HUANG Jun. Advances in bacterial single-cell sequencing[J]. Microbiology China, 2025, 52(1): 101-113.

**摘要:** 细菌群体中细胞间的异质性是决定细菌耐药性和毒力上的关键因素, 并在宿主与病原体间的相互作用中起着至关重要的作用, 为细菌性感染病的防治带来了重大挑战。单细胞测序是检测细胞异质性的有力工具, 但由于细菌独特的生物学特性, 如基因组较小、mRNA 含量低、半衰期短、无 PolyA 尾、转录组中 rRNA 占比高和细胞壁厚等, 使得基于真核细胞的单细胞测序方法不能应用于细菌。为了克服这些障碍并促进单细胞技术在细菌研究领域的发展, 研究人员成功研发了适用于细菌的单细胞测序方法。本文系统综述了近年来提出的细菌单细胞转录组测序和基因组测序技术, 描述了其特点并着重分析了这些技术在揭示细菌耐药性方面的应用, 旨在为相关研究提供新的视角。细菌单细胞测序可以深入揭示细菌异质性, 提高疾病诊断和治疗的准确性, 为细菌学和感染病学的研究提供支持。

**关键词:** 细菌; 单细胞测序; 细菌感染; 转录组

## Advances in bacterial single-cell sequencing

LIU Maomao<sup>1</sup>, CHEN Huan<sup>2,3</sup>, GAO Yuan<sup>1</sup>, ZHAO Beibei<sup>1</sup>, RONG Yawen<sup>\*1</sup>, HUANG Jun<sup>\*1</sup>

1 School of Biological & Chemical Engineering, Zhejiang University of Science and Technology, Hangzhou 310023, Zhejiang, China

2 School of Life Sciences, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, Zhejiang, China

3 Hangzhou Digital-Micro Biotech Limited Company, Hangzhou 311215, Zhejiang, China

**Abstract:** Intercellular heterogeneity in bacterial populations is a crucial factor determining

资助项目: 国家重点研发计划(2021YFF0600805)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2021YFF0600805).

\*Corresponding authors. E-mail: RONG Yawen, awen1211@zust.edu.cn; HUANG Jun, huangjun@zust.edu.cn

Received: 2024-04-08; Accepted: 2024-05-30; Published online: 2024-06-25

bacterial antibiotic resistance and virulence and plays a key role in host-pathogen interactions, posing a major challenge to the control of bacterial infections. Single-cell sequencing is a powerful tool for detecting cellular heterogeneity. However, bacteria have unique biological characteristics such as small genomes, low cellular mRNA contents, and high proportion of rRNAs in the transcriptome, short half-life, PolyA tail-lacking mRNA transcripts, and thick cell walls, making the eukaryote-based single-cell sequencing methods impossible to be applied in bacteria. To overcome these obstacles and promote the development of single-cell technology in bacterial research, researchers have successfully developed the single-cell sequencing methods applicable to bacteria. This review systematically summarizes the bacterial single-cell transcriptome sequencing and genome sequencing technologies proposed in recent years, describes their characteristics, and discusses the application prospects of bacterial single-cell sequencing in revealing bacterial drug resistance, aiming to shed light on the subsequent the related research. Bacterial single-cell can deeply reveal bacterial heterogeneity, improve the accuracy of disease diagnosis and treatment, and support microbiological and infectious disease research.

**Keywords:** bacteria; single-cell sequencing; bacterial infections; transcriptome

细菌是一类结构简单、胞壁坚韧的单细胞原核生物,广泛存在于自然界的各种环境中,在参与生物地球化学循环中发挥着关键作用,具有重要的生态功能、生理作用和医学价值。由于基因水平转移、基因突变和环境变化等因素导致细菌具有表型异质性<sup>[1]</sup>,主要体现在细菌耐药性与毒力方面。表型异质性是细菌适应环境的一种手段,赋予细菌多种能力以抵抗环境压力,对其生存至关重要<sup>[2]</sup>。异质性耐药性(又称异质抗生素耐药性)是一种特殊形式的表型异质性<sup>[3]</sup>,具体表现为即使在同一种群中,不同亚群对抗生素也会表现出不同的耐药反应<sup>[4]</sup>。用传统方法难以检测的细菌耐药亚群在抗生素压力下仍会迅速增殖,这可能会导致反复感染和治疗失败,给临床治疗带来了重大挑战。单细胞测序技术作为一种强大的工具,能够从单个细胞的层面探索细菌在基因表达、代谢活动和适应性反应方面的差异,突破了传统测序技术在捕捉细菌复杂动态中的局限性,提供了深入理解细菌的新途径。

作为原核生物,细菌的每个细胞都是一个

完整的遗传个体,包含了自身和其他内共生体的全部遗传信息<sup>[5]</sup>。相较于真核生物,细菌的种类多样性增加了细胞裂解的难度,此外,细菌 mRNA 不具备 PolyA 尾,导致其 mRNA 稳定性较差<sup>[6]</sup>。同时,细菌细胞 mRNA 含量较低、半衰期短且 rRNA 在转录组中占比较高<sup>[7]</sup>,这使得从细菌中分离出 mRNA 具有一定难度。为了克服这些挑战,研究人员开发了多种适用于细菌的单细胞测序方法,以提高细胞裂解效率,优化 mRNA 的捕获和扩增过程,推动了单细胞测序在细菌学领域的发展与应用。

单细胞测序技术在细菌领域的应用,不仅有助于理解细菌在个体层面上应对抗生素压力的机制,还推动了对未知病原体的识别和耐药性追踪的研究,从而有助于进行疾病的诊断和机制研究<sup>[8]</sup>。此技术同样可以推动合成生物学中酶活性、稳定性的优化<sup>[9-13]</sup>和特异性识别适配体的筛选<sup>[14-18]</sup>,促进快速灵敏检测农产品危害物的纳米传感检测技术的发展,进而保障食品和农产品安全。因此,本文聚焦于近年来涌现的细菌单细胞转录组测序(single-cell RNA

sequencing, scRNA-seq)技术和单细胞基因组测序(single-cell DNA sequencing, scDNA-seq)技术及其特点,同时深入探讨了各种方法在实际应用中的优缺点。在此基础上,对单细胞测序技术在细菌耐药研究与合成生物学领域的发展及应用前景做出展望,以期促进单细胞测序技术在细菌感染疾病领域和合成生物学领域的应用。

## 1 单细胞转录组测序

抗生素的广泛使用增强了细菌适应性和耐药性,从而加剧了耐药性和毒力的表型异质性,使得部分细菌更易于适应和抵御抗生素压力。scRNA-seq 技术能够探索基因组组成或遗传背景相同的细菌群体中个体间的表型异质性<sup>[19]</sup>,有助于理解病原体在宿主体内的适应、存活和传播方式。这为更好地理解细菌的生物学特性和行为模式,为抗菌药物和疫苗的研发提供了有力支持。近年来,一系列细菌 scRNA-seq 技术被提出,主要包括基于多重退火和尾部定量的 scRNA 测序方法(multiple annealing and dC-tailing-based quantitative single-cell RNA-seq, MATQ-seq)<sup>[20]</sup>、通过原位标记 RNA 和测序的原核表达谱分析(prokaryotic expression profiling by tagging RNA *in situ* and sequencing, PETRI-seq)<sup>[21]</sup>、微生物分离池连接的转录组学方法(microbial split-pool ligation transcriptomics, MicroSPLIT)<sup>[22]</sup>、并行连续荧光原位杂交(parallel sequential fluorescent *in situ* hybridization, par-seqFISH)<sup>[23]</sup>、微生物单细胞 RNA 测序(microbial-single-cell RNA sequencing, MscRNA-seq)<sup>[24]</sup>基于探针的细菌测序(probe-bacteria sequencing, ProBac-seq)<sup>[25]</sup>、大规模并行多重微生物测序(massively-parallel multiplexed microbial sequencing, M3-seq)<sup>[26]</sup>和单微生物 RNA 测序(single-microbe RNA sequencing, smRandom-seq)<sup>[27]</sup>等。这些测序技术的出现证实

了 scRNA-seq 在研究细菌异质性方面的可行性,特别是在致病菌的检测与溯源、药物的筛选和细菌耐药性等领域具有重要意义。

### 1.1 MATQ-seq

MATQ-seq 是基于多重退火和尾部定量的真核 scRNA-seq 方法,通过引入独特的分子标识符减少 PCR 扩增偏差,对单细胞总 RNA 的测序实现了较好的灵敏度和定量性<sup>[28]</sup>,2020 年 Imdahl 等<sup>[20]</sup>改良了该方法,使用流式细胞荧光分选技术(fluorescence-activated cell sorting, FACS)实现单个细菌的分离,并使用酶解法裂解细胞克服了细菌 scRNA-seq 过程中的细胞裂解难题,实现了对细菌的单细胞测序,但是也存在操作烦琐、通量较低的缺陷<sup>[29]</sup>。2023 年 Homberger 等<sup>[30]</sup>进一步优化,引入自动化技术和更高效的逆转录酶 SuperScript IV 并通过杂交去除丰富序列(depletion of abundant sequences by hybridization, DASH)的方法去除 rRNA。此研究显著提升了 MATQ-seq 的基因检测能力和基因覆盖率,使其能够检测 sRNA,同时也降低了测序成本并提高了数据质量。优化后的 MATQ-seq 对不同生长条件下的沙门氏菌(*Salmonella*)进行基因表达分析发现了与致病相关基因的表型异质性<sup>[30]</sup>。这些异质性信息对于研究与人类健康密切相关的病原体的传播和耐药性机制尤为重要。改进的 MATQ-seq 凭借其低细胞损失率和基因检测限的优势,适用于对样本量或细胞数量有限的研究,如感染组织中的细菌和持久性细胞。这些细胞在群体中不易被发现,可能携带独特的耐药基因或具有特殊的耐药机制,而传统测序技术难以捕捉到它们的存在和行为。利用该技术对这些样本进行测序可以获取关键的遗传信息,深入理解细菌的耐药异质性和发展机制,有助于优化抗菌疗法,提高抗生素治疗效果。

## 1.2 PETRI-seq

PETRI-seq 是在分离池连接的转录组测序技术(split pool ligation-based transcriptome sequencing, SPLiT-seq)<sup>[31]</sup>的基础上,通过原位标记 RNA 分析原核蛋白表达的一种低成本、高通量的 scRNA-seq 方法。在分离条形码过程中,通过减小每个连接反应的悬垂序列来缩短测序周期,从而降低了测序成本。研究者使用 PETRI-seq 对处于指数生长期的金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)和大肠杆菌(*Escherichia coli*)的混合样本进行测序,结果表明 PETRI-seq 技术能够高纯度、低偏差地捕获革兰氏阴性菌和革兰氏阳性菌的转录组<sup>[21]</sup>,有助于更好地了解基因表达的调控机制和代谢途径,进一步促进细菌在宿主体内生存机制的研究。研究人员通过对野生型金黄色葡萄球菌测序发现一个罕见的细胞亚群正在经历原噬菌体诱导,对 2 个生长阶段的大肠杆菌混合样本进行测序发现了其稳定期相关基因表达、核糖体蛋白表达和氨基酸生物合成的预期趋势<sup>[21]</sup>。这些发现强调了 PETRI-seq 在解析复杂微生物群落中细菌不同生长状态和转录状态的能力,为揭示细菌的基因表达、转录趋势及其耐药性的发展提供了重要见解,从而促进了耐药菌株防治策略的制定。

## 1.3 MicroSPLiT

MicroSPLiT 同样基于 SPLiT-seq 技术,是使用组合条形码标记技术的一种高通量单细胞 RNA 测序技术。使用吐温-20 和溶菌酶处理细胞壁并采用 polyA 加尾酶对 mRNA 进行多聚腺苷酸化操作,有效应对单细胞测序过程中细菌细胞裂解难和 mRNA 捕获效率低的挑战<sup>[22]</sup>。研究人员使用 MicroSPLiT 分析枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)不同生长阶段的基因表达并创建了其生长周期内的特征转录图谱,发现了细菌亚群在代谢、应激反应或发育途径方面的基

因表达的异质性<sup>[22]</sup>,结果表明 MicroSPLiT 可用于识别多种环境中的细菌细胞的异质性,进而揭示细菌耐药机制。这有助于设计更有效的抗生素并优化现有药物使用策略,从而避免无效治疗,减缓细菌耐药性的进一步发展。MicroSPLiT 能够检测到稀有度高达 0.142% 的细胞亚群,展示了其在揭示与生理状态相关的罕见细胞状态(如持久性)方面的潜力,这是其他测序技术难以实现的<sup>[22]</sup>。MicroSPLiT 在研究细菌异质性和群落行为方面不仅对于理解和控制细菌耐药性具有重要价值,还为解析生物合成路径中关键酶的调控机制提供了有效的研究手段。

## 1.4 par-seqFISH

par-seqFISH 技术结合了连续荧光原位杂交(sequential fluorescence *in situ* hybridization, seqFISH)<sup>[32]</sup>和并行图像采集,是一种微生物种群 scRNA-seq 方法。seqFISH 能够在单细胞水平直接鉴定数千种分子,如 RNA、DNA 和蛋白质,并保留空间背景信息<sup>[32]</sup>。由于 seqFISH 监测成像周期太长,研究人员在此基础上改进开发了 par-seqFISH 方法,即采用专门设计的靶向 16S rRNA 的一级探针,可以有效提高对各种细菌在不同状态下的基因表达状况的分析效率<sup>[23]</sup>。该技术不仅可以在单细胞和分子级别上精确捕获基因表达谱并保留空间背景信息,还能直接将细胞中的特定参数(如核糖体结构或细胞形状)与基因表达特征相关联<sup>[23]</sup>,为深入理解细胞功能和调控机制提供强有力的支持。Par-seqFISH 已被应用于铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)的浮游生物和生物膜种群,揭示了细胞功能在时间和空间上协调作用机理,展现了从亚细胞水平到微观尺度的高度转录异质性,证实了同一生物膜可以包含具有不同生理活性的、共存但相互独立的亚群<sup>[23]</sup>。凭借其出色的空间分辨能力,par-seqFISH 为研

究细菌生物膜的功能组织和发育过程提供了重要工具。将该技术应用于自然及临床样本,可以揭示微生物在复杂环境中的动态变化和生长调节机制,这对于指导疾病诊断和制定治疗方案至关重要,有助于优化治疗措施。

### 1.5 MscRNA-seq<sup>[24]</sup>

MscRNA-seq (收录于 M20 Seq<sup>®</sup>)是全球首个商用的高通量 scRNA-seq 技术<sup>[24]</sup>。MscRNA-seq 能够获得单细胞级别的转录组数据,为深入探究细菌的基因表达模式及其在不同环境中的调控机制提供了工具支持。这将对研究细菌的耐药、致病、持留及细菌与宿主的相互作用等起到巨大的推动作用。该商业平台的发布意味着用于细菌的 scRNA-seq 技术已经进入商业化阶段,有望推动 scRNA-seq 在与细菌相关的基础研究和临床方面的应用,为应对日益严峻的细菌耐药和感染问题提供实质性的帮助。

### 1.6 ProBac-seq

ProBac-seq 是一种使用 DNA 探针库和商业微流控平台进行细菌 scRNA-seq 的方法<sup>[25]</sup>。该方法采用特制探针与细菌内的目标 mRNA 序列特异性结合的方式有效避免了 mRNA 降解和丢失,即使在 mRNA 含量较低的情况下也能有效捕获 mRNA 分子。使用 ProBac-seq 对枯草芽孢杆菌和大肠杆菌进行测序,不仅确认了已知的细胞状态,还揭示了新的转录状态<sup>[25]</sup>。这些新发现的转录状态涉及的基因主要负责氨基酸代谢、碳代谢、铁载体、趋化性和运动性等多种生理功能,进一步证实了 ProBac-seq 可以精确捕捉细胞内真实转录组特征。这些特征是理解细菌行为、开发治疗方案及优化工业生物技术的关键。该技术在实际病原体研究中的应用,如发病机制下的产气荚膜梭菌(*Clostridium perfringens*)的研究,揭示了毒素表达的异质性

可以通过乙酸盐来调控<sup>[25]</sup>,突显了其在解析细菌对环境适应、存活和传播方式方面的价值。这些发现有助于识别影响病原体致病性的关键因素,发现新的生物标志物或药物靶点,为设计针对性治疗和管理抗生素耐药提供支持。ProBac-seq 技术的应用展示了其在测试新设计的基因元件(如启动子、核糖体结合位点等)及代谢路径功能方面的能力,有助于设计和验证新的生物系统与通路,极大地推动了合成生物学领域的发展。

### 1.7 M3-seq<sup>[26]</sup>

M3-seq 是一种将组合索引技术与事后 rRNA 去除相结合的大规模并行、多路复用的 scRNA-seq 技术。它使用双链特异性核酸酶和特异性 DNA 探针去除 rRNA,既降低了丢失未扩增的非 rRNA 转录本的风险,又提高了测序的通量和灵敏度。M3-seq 能够在单个实验中分析多个物种的细胞在不同条件下的状态,也适合处理大规模细胞样本。研究人员使用 M3-seq 对数十万个细胞进行分析,发现了稀有细菌群体并提供了细菌应对环境压力和噬菌体感染的新见解<sup>[26]</sup>。研究表明 M3-seq 有助于实现细菌对抗生素暴露、极端 pH 值、高温或低温等环境压力的适应能力的探究<sup>[26]</sup>。此外,该技术还可用于研究噬菌体对细菌的特异性识别、感染及杀死的过程,了解细菌表面的受体、细胞内的防御机制以及噬菌体逃逸宿主免疫系统,这有助于开发新的抗生素或噬菌体疗法以对抗耐药细菌。M3-seq 通过识别和分析微生物群体中的稀有细胞,从而能够提前发现并应对潜在的新兴病原体,尤其是在免疫系统失调或抗生素选择压力下。尽管 M3-seq 在处理细胞数量和 rRNA 去除方面具有优势,但其在回收细胞数量和对不同细菌的细胞捕获率等方面存在较大差异,未来研究中需要进一步优化。

## 1.8 smRandom-seq<sup>[27]</sup>

smRandom-seq 是一种基于液滴的高通量、高灵敏度的 scRNA-seq 方法。该方法采用随机引物原位生成 cDNA, 利用液滴微流控技术进行条形码编码并结合基于 CRISPR 的 rRNA 去除技术以富集 mRNA, 具有条形码效率高、物种特异性高、交叉污染小和自动化能力强等优点。研究人员利用 smRandom-seq 对处于抗生素压力下的大肠杆菌进行测序发现, 在环丙沙星的作用下, 识别出具有不同 SOS 响应和代谢路径的表达模式的细菌亚群, 这些亚群可能是未来抗生素抗性研究的重要靶点<sup>[27]</sup>。这些发现不仅增加了对细菌群落内个体差异的认识, 也为开发新的抗生素或治疗策略提供了潜在的基础。在高浓度氨苄西林作用下大肠杆菌种群具有不同的反应模式, 传统的 RNA-seq 忽略了这种异质性但 smRandom-seq 很好地表征了这种异质性。此外, 将 smRandom-seq 应用于不同的细菌混合样本进一步证实了该技术能够揭示细菌适应环境及其相互作用的动态过程<sup>[27]</sup>。利用该方法可以预测细菌亚群的耐药性, 这对疾病的预防、新型抗生素治疗方案的开发及复杂环境中跨物种相互作用的解读具有重要意义。利用深入分析微生物在特定压力下的转录组变化的功能, smRandom-seq 还可以用于高通量药物的筛选和特异性生物传感器系统的设计。

## 1.9 不同 scRNA-seq 方法比较

综上, 对以上几种 scRNA-seq 技术从应用范围、通量、mRNA 捕获效率和分辨率等方面进行综合的比较, 如表 1 所示。在测序通量方面, MicroSPLiT、smRandom-seq 等可以实现高通量测序, 能够处理和分析成千上万的单细胞数据, 从大规模数据中捕捉到细微的生物学差异, 从而揭示细菌个体间的异质性。尽管

MATQ-seq 通量较低, 但它的灵敏度高, 有助于从有限的样品中识别独特的抗生素耐药基因或机制。在灵敏度方面, MATQ-seq、PETRI-seq 和 MscRNA-seq 相较于其他几种技术具有更高的灵敏度。虽然 PETRI-seq 和 MicroSPLiT 裂解效率低, 但由于使用了通用的裂解方法, 适用性更广<sup>[33]</sup>。在细胞分辨率方面, MATQ-seq 可以达到超分辨率级别, 而 MscRNA-seq、ProBac-seq 和 smRandom-seq 可以达到单细胞/亚细胞级别, 能够更好地识别细菌细胞之间的微小差异, 如细菌耐药亚群的检测。这对于发现新的耐药机制和疾病治疗靶点发挥了关键作用。此外, MicroSPLiT、MscRNA-seq、M3-seq 和 smRandom-seq 具有空间信息保留能力, 对于理解细菌的相互作用和环境适应过程至关重要。MscRNA-seq 和 smRandom-seq 适用于混合样本测序, 这对于理解微生物群落在生态系统中的作用、发现新物种、疾病诊断和治疗等方面具有重要意义。

这些技术凭借其高分辨率、高通量或高灵敏度的特性助力于细菌复杂行为的研究和探索, 可以推动细菌学、感染病学和生态学等多个领域的进步和发展。scRNA-seq 技术对实验设计和处理的要求较为复杂, 需要根据实际需求选择合适的技术。

## 2 细菌单细胞基因组测序

单细胞基因组测序技术对单个细菌的基因组进行高精度和高分辨分析, 有助于深入了解细菌的遗传背景、变异和进化。该技术可用于检测基因突变、耐药基因和毒力基因, 在细菌感染病领域的应用前景广泛, 如跟踪病原体的持久性和传播, 靶向和非靶向病原体的基因组重构, 从人类微生物组中鉴定具有致病潜力的新型细菌等<sup>[34]</sup>。

表 1 不同 scRNA-seq 方法的特点

Table 1 Characteristics of different bacterial scRNA-seq methods

方法 Method	应用生物 Applied organism	通量 Throughput	细胞数 Cell number	每个细胞的 原始读数 Reads/Cell	检测基因数 Detected gene	rRNA (%)	mRNA (%)	分辨率 Resolution
MATQ-seq	沙门氏菌 <i>Salmonella</i>	较低 Lower	96	~10 M	>375 (平均数) >375 (mean)	–	–	超分辨率 Super-resolution
PETRI-seq	大肠杆菌 <i>Escherichia coli</i> 金黄色葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i>	高 High	3 563	~9 k	–	85 75	15 25	单碱基级别 Single-base level
MicroSPLiT	大肠杆菌 <i>Escherichia coli</i> 枯草芽孢杆菌 <i>Bacillus subtilis</i>	高 High	1 443 1 217	~40 k	138 (中位数) 138 (median) 230 (中位数) 230 (median)	71 9	28 90	单细胞级别 Single-cell level
par-seq/FISH	铜绿假单胞菌 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	高 High	数千个 Thousands	–	105	–	–	单细胞/分子 级别 Single-cell/ molecular level
MscRNA-seq	混合菌(鲍曼不动杆菌、 大肠杆菌、肺炎克雷 伯菌、铜绿假单胞菌、 金黄色葡萄球菌) Mixed bacteria ( <i>Acinetobacter baumannii</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> )	高 High	1 000–20 000	–	150–200 (中位数) 150–200 (median)	–	–	单细胞/亚细 胞级别 Single-cell/ subcellular level
ProBac-seq	枯草芽孢杆菌 <i>Bacillus subtilis</i>  大肠杆菌 <i>Escherichia coli</i>  产气荚膜梭菌 <i>Clostridium perfringens</i>	高 High	数千个 Thousands	1 073 (测序深度) 1 073 (average depth)	241 (中位数) 241 (median)	–	10–20	单细胞/亚细 胞级别 Single-cell/ subcellular level
M3-seq	枯草芽孢杆菌 <i>Bacillus subtilis</i> 大肠杆菌 <i>Escherichia coli</i> 铜绿假单胞菌、金黄色 葡萄球菌 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Staphylococcus aureus</i>	高 High	数十万个 Hundreds of thousands	720 (中位数) 720 (median) 1 902 (中位数) 1 902 (median)	298 (中位数) 298 (median) 151 (中位数) 151 (median)	75–80	–	单细胞级别 Single-cell level
smRandom-seq	混合菌(大肠杆菌、枯草 芽孢杆菌) Mixed bacteria ( <i>Escherichia coli</i> , <i>Bacillus subtilis</i> )	高 High	7 645	~50 k	1 000 (中位数) 1 000 (median)	32	63	单细胞/亚细 胞级别 Single-cell/ subcellular level

–: 文献中未找到相关信息。

–: The relevant information was not found in the literature.

## 2.1 技术介绍

2022年 Bawn 等<sup>[35]</sup>开发了一种 scDNA-seq 方法, 利用 FACS 分离数百个细菌并进行全基因组扩增和测序, 能够高通量、可靠地捕获种群内单个细菌的单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)。该方法被用于研究沙门氏菌的超突变菌株在环丙沙星抗生素压力下的进化, 成功识别了具有独特耐药 SNP 的亚群, 结果表明在抗生素压力下菌群能够在维持多样性的同时发展出耐药性。此外, 通过 SNP 分析和系统发育树的构建, 揭示了细菌亚群在抗生素压力下的适应和进化轨迹<sup>[35]</sup>。这一研究不仅提高了对群落中细菌个体差异的理解, 还对公共卫生管理、优化抗生素使用、开发新型抗生素以及全球抗生素耐药性的监控和管理均具有重要意义。

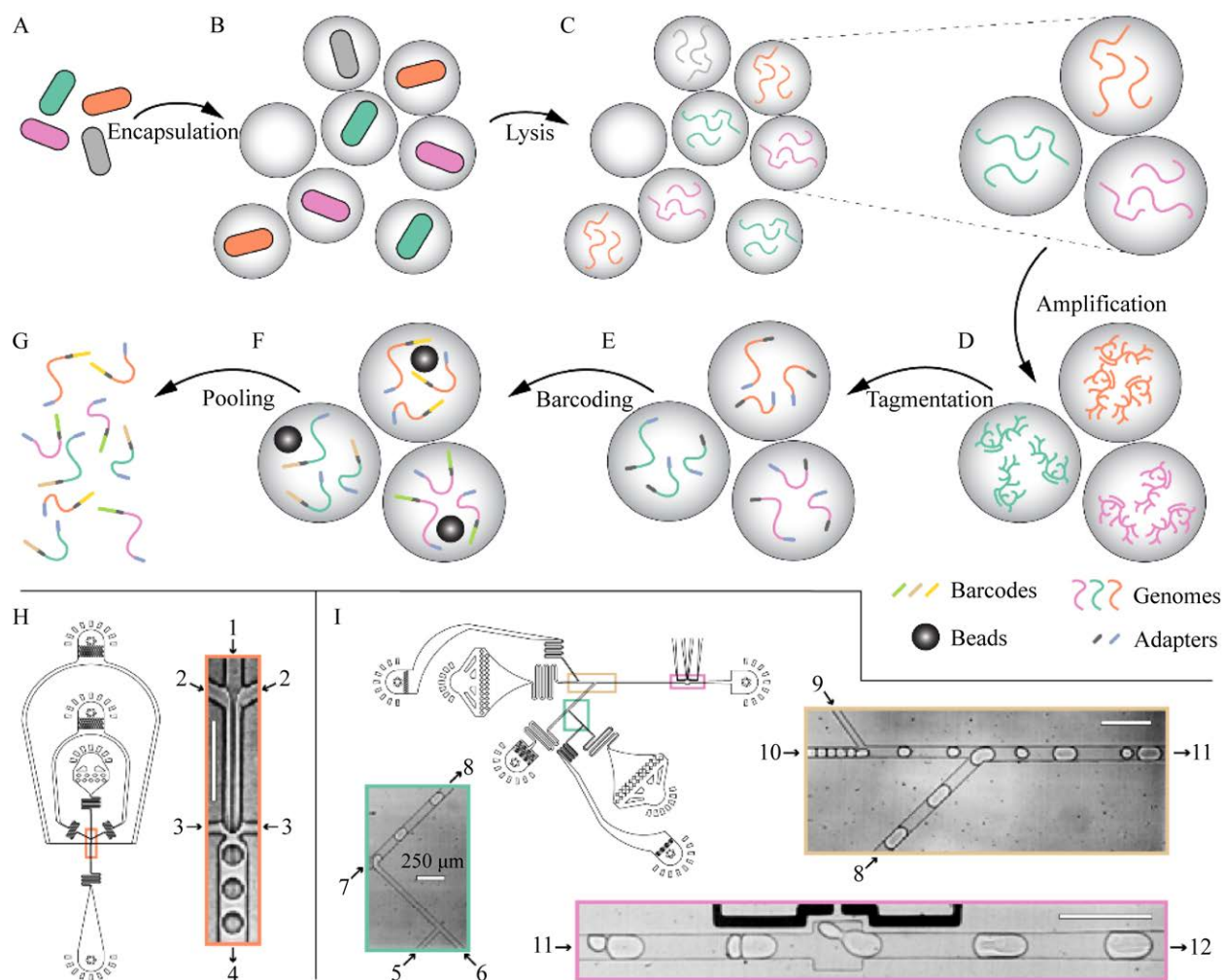
自然环境中高达 99% 的微生物尚未被培养和研究, 无论在物种多样性、代谢途径、生理生化反应还是产物方面, 它们都展示出极大的新颖性和多样性<sup>[36]</sup>。目前基于培养的测序方法主要针对容易培养的少数微生物菌株, 因此开发未培养的细菌 scDNA-seq 技术分析病原体对于微生物学的进步具有深远意义。

2022年 Zheng 等<sup>[37]</sup>研制出基于微流控技术的高通量单细胞基因组测序方法 Microbe-seq。Microbe-seq 技术具有菌株水平分辨率, 不需要培养即可从复杂的微生物群落中获取单个微生物的基因组信息。通过结合微流控液滴操作和生物信息学分析方法, Microbe-seq 能够组装出高质量的菌株水平基因组, 广泛适用于研究多种微生物群落, 具体工作流程及微流控装置如图 1 所示。研究人员将 Microbe-seq 应用于人体肠道微生物样本获得了 21 914 个单扩增基因组(single-amplified genome, SAG), 从中组装出 76 个物种级别基因组并建了菌株的水平基因转

移网络, 发现同一细菌门的菌株间基因转移情况显著多于不同细菌门的菌株间的转移, 显示出 Microbe-seq 在揭示群落内微生物相互作用的能力<sup>[37]</sup>。Microbe-seq 增加了对微生物群落中复杂的基因水平转移和环境适应性的理解, 对研究抗生素耐药性的发展和传播具有重要意义, 为抗生素的合理使用和耐药性管理提供指导。同时, 该技术还揭示了未知物种的存在, 研究它们或可以发现新的生物活性物质, 为药物、酶和其他工业产品的开发提供新资源。

2020年 Chijiwa 等<sup>[38]</sup>开发了基于凝胶的单细胞扩增基因组测序平台(single-cell amplified genomes in gel beads sequencing, SAG-gel), 该平台可以对肠道微生物组中未培养的细菌进行功能分析, 开辟了肠道微生物研究的新途径。2022年 Nishikawa 等<sup>[39]</sup>对此技术进行了改进, 提高了 16S rRNA 基因回收率, 还揭示了细菌种群内部的遗传异质性, 为深入理解细菌代谢功能差异和感染过程提供了新方法。Hosokawa 等<sup>[40]</sup>结合叠氮溴化丙锭(propidium monoazide, PMA)和 SAG-gel 发明了一种针对活细菌的 scDNA-seq 方法 PMA-SAG-gel。PMA-SAG-gel 通过有效抑制非活细胞的全基因组扩增可以获取活细菌的基因组信息, 这对评估活细菌产品质量、检测抗微生物治疗效果、追踪传染病病原体的传播途径及确定感染源具有重要作用, 同时有助于识别和分析在抗生素处理下仍能存活的细菌菌株, 揭示其耐药机制, 为开发新的抗生素策略和管理抗生素耐药提供支持。Kogawa 等<sup>[41]</sup>基于 SAG-gel 平台开发了一种单细胞扩增基因组长读长组装流程(single-cell amplified genome long-read assembly, scALA), 从未培养细菌的测序数据中构建了完整的环状单扩增基因组(circular SAG, cSAG)。这有助于扩展细菌基因组数据库并提





**图 1 Microbe-seq 工作流程和微流控装置设计及操作方法示意图<sup>[37]</sup>** A–G: Microbe-seq 工作流程示意图: 首先使用液滴微流控技术将细胞单独地包裹在液滴中, 接着在每个液滴内裂解细胞并释放 DNA, 然后进行全基因组扩增并将扩增后的 DNA 打断连上接头, 随后使用带有特定序列的标签标记液滴内的 DNA, 最后将每个液滴内的 DNA 合并进行建库测序; H: 分离微生物的装置设计及其分离过程; I: 将磁珠和聚合酶链式反应试剂加入液滴的装置设计及条形码编码过程。

Figure 1 Microbe-seq workflow and schematic illustration of the design and operation of the microfluidic device<sup>[37]</sup>. A–G: Microbe-seq workflow diagram: Initially, cells are individually encapsulated in droplets using droplet microfluidic technology. Subsequently, cells within each droplet are lysed to release DNA, followed by whole genome amplification, and the amplified DNA is fragmented and ligated with adapters. Next, DNA within the droplet is labeled with tags that have specific sequences, and finally, DNA from each droplet is pooled together for library construction and sequencing; H: Design of a device for isolating microorganisms and the process of microbial isolation; I: Device design for adding beads and polymerase chain reaction reagents into droplets and the process of barcode coding.

高对不可培养细菌种内多样性的理解。这些方法为研究细菌的多样性提供了新的技术支持。

SAG-gel 平台及其衍生技术的测序方法与技术

亮点详见表 2。

## 2.2 小结

Bawn 等<sup>[35]</sup>提出的方法利用 FACS 对浮游培

表 2 SAG-gel 平台及其衍生技术对比

Table 2 Comparison of the SAG-gel platform and its derived technologies

技术名称 Technology	方法 Method	技术亮点 Technological highlight	参考文献 Reference
SAG-gel	使用皮克分子级别凝珠对单个细胞进行隔离,并在凝珠内进行多次裂解和全基因组扩增。通过荧光检测并分选后进行文库制备和下一代测序 Isolate individual cells using picomole-level droplets, perform multiple lyses and whole genome amplification within the droplets. After fluorescence detection and sorting, proceed with library preparation and next-generation sequencing	凝胶隔离 提高了基因组覆盖率 提高了 16S rRNA 基因回收率 Isolation of gel bead Increases genome coverage Increases the recovery rate of the 16S rRNA gene	[38]
SAG-gel	利用超低熔点的琼脂糖将细菌悬浮液封装进 40 微米的凝珠中进行细胞裂解和全基因组扩增。通过 FACS 分离后进行文库制备和下一代测序 Utilize ultra-low melting point agarose to encapsulate bacterial suspensions into 40-micron droplets for cell lysis and whole genome amplification. After separation by FACS, proceed with library preparation and next-generation sequencing	菌株级别分辨率 适用于广泛的环境样本 进一步提高了 16S rRNA 基因回收率 Strain-level resolution Applicable to environmental samples Further increased the recovery rate of the 16S rRNA gene	[39]
PMA-SAG-gel	通过 PMA 处理细菌悬浮液,防止死细胞 DNA 扩增,之后采用 SAG-gel 进行测序 Treat the bacterial suspension with PMA to prevent the amplification of dead cell DNA, and then perform sequencing using SAG-gel	筛选评估活细菌 适用于复杂样本 The quality assessment of live bacterial Applicable to complex samples	[40]
scALA	采用 SAG-gel 对基因组进行扩增,采用长读长测序技术对 SAG 测序,对从 SAG 获得的原始单细胞长读序列进行多次循环组装,最终获得 cSAG Amplify the genome using SAG-gel and perform SAG sequencing with long-read sequencing technology. The raw single-cell long-read sequences obtained from SAG are then iteratively assembled to eventually obtain cSAGs	高度完整的环状基因组 解决了基因组扩增中的嵌合序列问题和扩增偏差 Highly complete circular genome Addressed the issues of chimeric sequences and amplification bias in genome amplification	[41]

养的细菌个体进行分离,揭示了细菌种群结构的演变以及耐药性的形成,为理解细菌在抗生素压力下的适应提供了数据支持。Microbe-seq 采用微流控技术,具有高通量、自动化和灵活性高的优势,从复杂的微生物群落中获取单个微生物的基因组信息而无须培养,用于研究复杂微生物群落的相互作用极大地推动了对复杂微生物群体互动的理解,为研究微生物生态系统的深层次动态开辟了新的视角。SAG-gel 及其衍生技术采用凝胶技术实现了对 DNA 的物

理隔离和保护,提高了基因组数据的获取率和质量。这些技术不仅推动了对微生物多样性的探索和未培养微生物的研究,还为细菌耐药性问题的解决提供了新的策略。

以上几种技术旨在揭示单个细菌的基因组信息,为深入理解菌群功能和作用机制提供了强大工具,可以促进发现新的治疗靶点和制定对抗细菌感染的策略,在合成生物学中关键生物催化剂的设计和改进行方面有着广泛的应用前景。

### 3 总结与展望

新方法的层出不穷促进了细菌的高通量单细胞测序技术的发展,为研究者提供了更多的方法,使研究者可以更系统、更全面地探究耐药菌株的毒力和致病机制,这对于应对超级细菌的全球性挑战极为重要。单细胞测序技术在感染生物学和传染病诊断等许多领域都具有广阔的应用前景,如检测未知微生物、监测耐药菌株、研发抗感染药物等。细菌是生态系统的重要组成部分,对细菌异质性的研究有助于揭示其生命活动规律,在人类健康和生物溯源等领域发挥着重要作用。

尽管单细胞测序技术虽正处于快速发展阶段,但其在细菌中的应用仍受到多重挑战的制约。细菌体积小且结构复杂、基因组拷贝数的变异、实验中可能遇到交叉污染和PCR扩增偏差等问题均可能影响测序的精度和可信度。此外,缺少标准化的操作流程和数据分析框架也增加了单细胞测序数据解释和应用的难度。因此,细菌种群的研究工作仍需经年累日地探索,改进测序技术和制定标准化数据分析流程是未来研究的重点。

随着研究的不断推进,适用于细菌的单细胞测序技术将会朝着更高的精确度、更大的吞吐量、更低的成本,以及更易于在常规研究和临床试验中应用的趋势发展。随着新型分析方法的持续涌现,这项技术在探索细菌感染、理解微生物群落动态,以及在生命科学、医药开发和食品安全等领域中的应用将持续扩大,促进多学科融合与发展。

#### REFERENCES

[1] HUGHES D, ANDERSSON DI. Environmental and genetic modulation of the phenotypic expression of antibiotic resistance[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2017, 41(3): 374-391.

- [2] 王言吉,容丹,王佳平,王海立,高建议,韩延平,杨瑞馥,李勇枝. 模拟失重环境对大肠杆菌K12表型异质性亚群菌株的影响[J]. 微生物学通报, 2018, 45(10): 2112-2120.  
WANG YJ, RONG D, WANG JP, WANG HL, GAO JY, HAN YP, YANG RF, LI YZ. Effect of simulated weightlessness on *Escherichia coli* K12 phenotypic heterogeneous strains[J]. Microbiology China, 2018, 45(10): 2112-2120 (in Chinese).
- [3] ANDERSSON DI, NICOLOFF H, HJORT K. Mechanisms and clinical relevance of bacterial heteroresistance[J]. Nature Reviews Microbiology, 2019, 17: 479-496.
- [4] LI PY, HUANG Y, YU L, LIU YN, NIU WK, ZOU DY, LIU HY, ZHENG J, YIN XY, YUAN J, YUAN X, BAI CQ. Isolation and whole-genome sequence analysis of the imipenem heteroresistant *Acinetobacter baumannii* clinical isolate HRAB-85[J]. International Journal of Infectious Diseases, 2017, 62: 94-101.
- [5] 王丹蕊,沈文丽,魏子艳,王尚,邓晔. 单细胞测序技术在微生物生态领域中的应用[J]. 生物技术通报, 2020, 36(10): 237-246.  
WANG DR, SHEN WL, WEI ZY, WANG S, DENG Y. Applications of single-cell sequencing technology in microbial ecology[J]. Biotechnology Bulletin, 2020, 36(10): 237-246 (in Chinese).
- [6] PASSMORE LA, COLLIER J. Roles of mRNA poly(A) tails in regulation of eukaryotic gene expression[J]. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2022, 23: 93-106.
- [7] BRENNAN MA, ROSENTHAL AZ. Single-cell RNA sequencing elucidates the structure and organization of microbial communities[J]. Frontiers in Microbiology, 2021, 12: 713128.
- [8] 陈碧清,刘细细,朱学军. 单细胞测序技术在传染病及微生物领域的应用研究进展[J]. 微生物学通报, 2022, 49(11): 4886-4892.  
CHEN BQ, LIU XX, ZHU XJ. Application of single-cell sequencing in infectious diseases and microbiology: a review[J]. Microbiology China, 2022, 49(11): 4886-4892 (in Chinese).
- [9] 夏凯,刘芳美,陈雨晴,陈珊珊,黄春莹,赵学群,沙如意,黄俊. 基于比较基因组学的解脂亚罗酵母CA20高产赤藓糖醇机理及进化分析[J]. 遗传, 2023, 45(10): 904-921.  
XIA K, LIU FM, CHEN YQ, CHEN SS, HUANG CY, ZHAO XQ, SHA RY, HUANG J. Mechanism and evolutionary analysis of *Yarrowia lipolytica* CA20 capable of producing erythritol with a high yield based on comparative genomics[J]. Hereditas (Beijing), 2023, 45(10): 904-921 (in Chinese).
- [10] 刘芳美,夏凯,彭艳婷,赵学群,沙如意,黄俊. 复合诱变选育高产赤藓糖醇解脂亚罗酵母及其发酵工艺优化[J]. 核农学报, 2023, 37(5): 907-916.  
LIU FM, XIA K, PENG YT, ZHAO XQ, SHA RY, HUANG J. Breeding of *Yarrowia lipolytica* strains with improved erythritol production by combined mutation

- and optimization of fermentation process[J]. Journal of Nuclear Agricultural Sciences, 2023, 37(5): 907-916 (in Chinese).
- [11] FAN FF, LIU CY, CAO JR, LYU CJ, QIU S, HU S, SUN TT, MEI JQ, WANG HP, LI Y, ZHAO WR, MEI LH, HUANG J. Turning thermostability of *Aspergillus terreus* (R)-selective transaminase At-ATA by synthetic shuffling[J]. Journal of Biotechnology, 2023, 364: 66-74.
- [12] XIA K, CHEN YQ, LIU FM, ZHAO XQ, SHA RY, HUANG J. Adaptive responses of erythritol-producing *Yarrowia lipolytica* to thermal stress after evolution[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2024, 108(1): 263.
- [13] CAO JR, FAN FF, LYU CJ, HU S, ZHAO WR, MEI JQ, QIU S, MEI LH, HUANG J. Pocket modification of  $\omega$ -amine transaminase AtATA for overcoming the trade-off between activity and stability toward 1-acetonaphthone[J]. Engineering, 2023, 30: 203-214.
- [14] RONG YW, HASSAN MM, WU JZ, CHEN S, YANG WC, LI YH, ZHU JJ, HUANG J, CHEN QS. Enhanced detection of acrylamide using a versatile solid-state upconversion sensor through spectral and visual analysis[J]. Journal of Hazardous Materials, 2024, 466: 133369.
- [15] RONG YW, HASSAN MM, OUYANG Q, ZHANG YL, WANG L, CHEN QS. An upconversion biosensor based on DNA hybridization and DNA-templated silver nanoclusters for the determination of acrylamide[J]. Biosensors & Bioelectronics, 2022, 215: 114581.
- [16] RONG YW, LI HH, OUYANG Q, ALI S, CHEN QS. Rapid and sensitive detection of diazinon in food based on the FRET between rare-earth doped upconversion nanoparticles and graphene oxide[J]. Spectrochimica Acta. Part A, Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2020, 239: 118500.
- [17] RONG YW, ALI S, OUYANG Q, WANG L, LI HH, CHEN QS. Development of a bimodal sensor based on upconversion nanoparticles and surface-enhanced Raman for the sensitive determination of dibutyl phthalate in food[J]. Journal of Food Composition and Analysis, 2021, 100: 103929.
- [18] LI HH, AHMAD W, RONG YW, CHEN QS, ZUO M, OUYANG Q, GUO ZM. Designing an aptamer based magnetic and upconversion nanoparticles conjugated fluorescence sensor for screening *Escherichia coli* in food[J]. Food Control, 2020, 107: 106761.
- [19] WESTERMANN AJ, VOGEL J. Cross-species RNA-seq for deciphering host-microbe interactions[J]. Nature Reviews Genetics, 2021, 22: 361-378.
- [20] IMDAHL F, VAFADARNEJAD E, HOMBERGER C, SALIBA AE, VOGEL J. Single-cell RNA-sequencing reports growth-condition-specific global transcriptomes of individual bacteria[J]. Nature Microbiology, 2020, 5: 1202-1206.
- [21] BLATTMAN SB, JIANG WY, OIKONOMOU P, TAVAZOIE S. Prokaryotic single-cell RNA sequencing by *in situ* combinatorial indexing[J]. Nature Microbiology, 2020, 5: 1192-1201.
- [22] KUCHINA A, BRETTNER LM, PALEOLOGU L, ROCO CM, ROSENBERG AB, CARIGNANO A, KIBLER R, HIRANO M, DEPAOLO RW, SEELIG G. Microbial single-cell RNA sequencing by split-pool barcoding[J]. Science, 2021, 371(6531): eaba5257.
- [23] DAR D, DAR N, CAI L, NEWMAN DK. Spatial transcriptomics of planktonic and sessile bacterial populations at single-cell resolution[J]. Science, 2021, 373(6556): eabi4882.
- [24] LIANGZHU LABORATORY, UNIV ZHEJIANG, HANGZHOU YUEZHEN BIOTECHNOLOGY CO LTD. High-throughput single-cell transcriptome sequencing method and use thereof: CN, WO2023221842A1[P]. 2023.11.23.
- [25] MCNULTY R, SRITHARAN D, PAHNG SH, MEISCH JP, LIU SC, BRENNAN MA, SAXER G, HORMOZ S, ROSENTHAL AZ. Probe-based bacterial single-cell RNA sequencing predicts toxin regulation[J]. Nature Microbiology, 2023, 8: 934-945.
- [26] WANG B, LIN AE, YUAN JY, NOVAK KE, KOCH MD, WINGREEN NS, ADAMSON B, GITAI Z. Single-cell massively-parallel multiplexed microbial sequencing (M3-seq) identifies rare bacterial populations and profiles phage infection[J]. Nature Microbiology, 2023, 8: 1846-1862.
- [27] XU ZY, WANG YT, SHENG KW, ROSENTHAL R, LIU N, HUA XT, ZHANG TY, CHEN JY, SONG MD, LV YX, ZHANG SJ, HUANG YJ, WANG ZL, CAO T, SHEN YF, JIANG Y, YU YS, CHEN Y, GUO GJ, YIN P, WEITZ DA, WANG YC. Droplet-based high-throughput single microbe RNA sequencing by smRandom-seq[J]. Nature Communications, 2023, 14: 5130.
- [28] SHENG KW, CAO WJ, NIU YC, DENG Q, ZONG CH. Effective detection of variation in single-cell transcriptomes using MATQ-seq[J]. Nature Methods, 2017, 14: 267-270.
- [29] IMDAHL F, SALIBA AE. Advances and challenges in single-cell RNA-seq of microbial communities[J]. Current Opinion in Microbiology, 2020, 57: 102-110.
- [30] HOMBERGER C, HAYWARD RJ, BARQUIST L, VOGEL J. Improved bacterial single-cell RNA-seq through automated MATQ-seq and Cas9-based removal of rRNA reads[J]. mBio, 2023, 14(2): e0355722.
- [31] ROSENBERG AB, ROCO CM, MUSCAT RA, KUCHINA A, SAMPLE P, YAO ZZ, GRAYBUCK LT, PEELER DJ, MUKHERJEE S, CHEN W, PUN SH, SELLERS DL, TASIC B, SEELIG G. Single-cell profiling of the developing mouse brain and spinal cord with split-pool barcoding[J]. Science, 2018, 360(6385): 176-182.
- [32] SHAH S, LUBECK E, ZHOU W, CAI L. seqFISH accurately detects transcripts in single cells and reveals robust spatial organization in the hippocampus[J]. Neuron, 2017, 94(4): 752-758.e1.

- [33] HOMBERGER C, BARQUIST L, VOGEL J. Ushering in a new era of single-cell transcriptomics in bacteria[J]. *microLife*, 2022, 3: uqac020.
- [34] 马素芳, 严景华. 单细胞测序技术及其在传染病研究领域中的应用[J]. *生物产业技术*, 2018(2): 85-90.  
MA SF, YAN JH. Single-cell sequencing technology and its application in infectious disease[J]. *Biotechnology & Business*, 2018(2): 85-90 (in Chinese).
- [35] BAWN M, HERNÁNDEZ J, TRAMPARI E, THILLIEZ G, Quince C, Webber MA, KINGSLEY RA, HALL N, MACAULAY IC. Single-cell genomics reveals population structures from *in vitro* evolutionary studies of *Salmonella*[J]. *Microbial Genomics*, 2022, 8(9): mgen000871.
- [36] 邢磊, 赵圣国, 郑楠, 李松励, 王加启. 未培养微生物分离培养技术研究进展[J]. *微生物学通报*, 2017, 44(12): 3053-3066.  
XING L, ZHAO SG, ZHENG N, LI SL, WANG JQ. Advance in isolation and culture techniques of uncultured microbes: a review[J]. *Microbiology China*, 2017, 44(12): 3053-3066 (in Chinese).
- [37] ZHENG WS, ZHAO SJ, YIN YH, ZHANG HD, NEEDHAM DM, EVANS ED, DAI CL, LU PJ, ALM EJ, WEITZ DA. High-throughput, single-microbe genomics with strain resolution, applied to a human gut microbiome[J]. *Science*, 2022, 376(6597): eabm1483.
- [38] CHIJIWA R, HOSOKAWA M, KOGAWA M, NISHIKAWA Y, IDE K, SAKANASHI C, TAKAHASHI K, TAKEYAMA H. Single-cell genomics of uncultured bacteria reveals dietary fiber responders in the mouse gut microbiota[J]. *Microbiome*, 2020, 8(1): 5.
- [39] NISHIKAWA Y, KOGAWA M, HOSOKAWA M, WAGATSUMA R, MINETA K, TAKAHASHI K, IDE K, YURA K, BEHZAD H, GOJOBORI T, TAKEYAMA H. Validation of the application of gel beads-based single-cell genome sequencing platform to soil and seawater[J]. *ISME Communications*, 2022, 2: 92.
- [40] HOSOKAWA M, ENDOH T, KAMATA K, ARIKAWA K, NISHIKAWA Y, KOGAWA M, SAEKI T, YODA T, TAKEYAMA H. Strain-level profiling of viable microbial community by selective single-cell genome sequencing[J]. *Scientific Reports*, 2022, 12: 4443.
- [41] KOGAWA M, NISHIKAWA Y, SAEKI T, YODA T, ARIKAWA K, TAKEYAMA H, HOSOKAWA M. Revealing within-species diversity in uncultured human gut bacteria with single-cell long-read sequencing[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2023, 14: 1133917.