

滕琳,籍月彤.以单细胞拉曼光谱为基础的细胞乙醇应激[J].江苏农业科学,2017,45(2):262-264,284.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.02.073

以单细胞拉曼光谱为基础的细胞乙醇应激

滕琳^{1,2},籍月彤¹

(1.中国科学院青岛生物能源与过程研究所单细胞研究中心,山东青岛 266101;2.中国科学院大学,北京 100049)

摘要:生物乙醇被认为是一种清洁的可再生能源,然而同时也是一种潜在的环境污染物。虽然目前关于细胞乙醇应激的研究已经非常广泛,但是细胞为生命活动的基本单元,对单细胞层面的细胞应激研究是非常必要的,有助于深化人们对单细胞进化的认识,然而目前在单细胞尺度进行细胞应激反应研究的方法还是非常有限的。拟采用单细胞拉曼光谱技术,对细胞在不同浓度乙醇处理下进行指纹图谱的检测,获得其单细胞应激的表型性状。结果表明,在不同浓度乙醇处理 30 min 的条件下,细胞可以非常灵敏地对外界刺激进行反应,主要表现在脂类、蛋白类拉曼谱峰的程度增强,以及表征核酸类物质的拉曼峰强度下降;同时,由于在不同浓度乙醇作用下细胞的不同反应,可以对细胞外环境中乙醇含量进行预测。由研究结果可见,细胞乙醇应激可以采用单细胞拉曼光谱进行检测,同时该技术还可以应用在对环境中存在的乙醇含量的预测方面。

关键词:乙醇刺激;单细胞拉曼光谱(SCRS);浓度预测

中图分类号: Q256 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)02-0262-03

目前,我国的机动车总数已经达到几亿辆的级别,汽车尾气的排放对细颗粒物(PM_{2.5})的“贡献”被认为是一个不可忽视的因素。生物乙醇可以利用废弃的秸秆或木质纤维素进行生产,不与人争粮,被认为是一种清洁的可再生能源,可以与汽油混合使用,能够更好地利用烷烃,并且提供更高的燃烧热量^[1]。然而,对于环境或环境微生物而言,生物乙醇也是一种潜在的污染物。人们在研究如何利用微生物高效生产乙醇的同时,对细胞的乙醇耐受性也进行了广泛的研究,涵盖基因组学、转录组学、蛋白质组学以及代谢物组学的各个领域,所涉及生物对象包括大肠杆菌^[2-3]、酵母^[4]及其他产乙醇的梭菌^[5],或整合生物加工(consolidated bioprocessing,简称 CBP)发酵中的其他功能菌株等,如嗜热纤维梭菌^[6],此外还有很多研究未在此一一列出。因此,本研究选择细胞对乙醇的应激具有广泛的研究基础。

鉴于单细胞研究在理解生物进化及生命的环境适应性方面的重要作用,单细胞拉曼光谱(SCRS)技术因无需标记、快速简便的特性已经日益得到广泛应用。最近发表的 1 篇关于单细胞拉曼光谱技术在细胞应激乙醇方面的研究^[7]表明,拉曼光谱的数据与传统试验方法具有很高的相关性。但是关于细胞在单细胞水平的乙醇应激研究目前尚未见报道。本研究立足于单细胞拉曼光谱的可靠性和不拘泥于群体水平研究的特点,旨在通过研究细胞对于不同浓度乙醇刺激的不同反应,认识细胞应对外界环境中乙醇的代谢层面的变化,对于深刻理解细胞的乙醇应激,以及对外界环境中存在的乙醇的检测

具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 材料与处理

本试验以大肠杆菌作为研究对象,因大肠杆菌具有丰富的研究背景、结构简单、缺乏免疫性、遗传操作简单,对其进行乙醇的生产和耐受研究在广度和深度上都是其他任何微生物所不能替代的。同时,大肠杆菌被认为是刺激响应的敏感体,由于其生长速度快,容易受到外界环境的影响,因此可以作为检测污水污染程度的理想细胞^[8]。

本试验采用的乙醇等药品为国药集团化学试剂有限公司生产的分析纯产品;碘化丙啶(PI)购自 Sigma,色谱纯,纯度≥94.0%。

在细胞培养过程中须要注意的是活化过程的一致性。因为拉曼光谱测量的严格性,细胞要经过比较严格的活化过程:先将-80℃保种的大肠杆菌在 LB 平板上于 37℃活化 16 h,然后将其转接入 2 mL 玻璃试管中,于 37℃培养 12 h 后,再转接入 120 mL 液体 LB 培养基中进行扩培,进行乙醇的刺激试验,试验中设置 6 个乙醇浓度(体积分数)梯度:0%、0.5%、1.0%、2.0%、3.0%、5.0%,分别处理细胞 30 min。此外,细胞在高浓度乙醇中的活性检测通过传统的碘化丙啶染色的方法进行。

1.2 单细胞拉曼光谱的采集

受刺激的细胞在经过 0.5 h 乙醇刺激后,进行细胞收集,条件为 5 200 r/min,2 min。用 ddH₂O 轻轻吹打,洗涤 3 次后稀释数百倍(使细胞能够分散于视野中,以便进行单细胞拉曼光谱的采集);而后吸取 1.5 μL 稀释的细胞悬液置于 CaF₂ 平板上,自然风干后,立即采用强度 100 mW、波长 532 nm 激光的拉曼系统进行信号采集,每个图谱采集时间 10 s(照射于细胞上的激光光照度约为 25 mW)。这部分的工作须要注意的事项:首先,细胞要尽量清洗干净,不能因用力过猛而使细

收稿日期:2015-12-04

基金项目:国家自然科学基金(编号:91231205)。

作者简介:滕琳(1985—),女,河北保定人,博士研究生,从事微生物遗传分析研究。E-mail:tenglin@qibebt.ac.cn。

通信作者:籍月彤,硕士,副研究员,从事单细胞拉曼技术应用开发。E-mail:jiyt@qibebt.ac.cn。

胞破碎;其次,风干过程要尽量迅速,避免细胞过长时间暴露于干燥的环境中,导致细胞破裂死亡。

1.3 数据处理及分析方法

采集到的单细胞拉曼光谱的处理,主要包括拉曼光谱的数据前处理和多变量分析。采集数据的形式:每个乙醇刺激浓度下设置 3 个生物学平行,每个平行测量 20 个独立的细胞,采集到的单细胞拉曼光谱数据共为 $6 \times 3 \times 20$ (即 360 个单细胞拉曼光谱)。

1.3.1 数据前处理 将以上得到的单细胞拉曼光谱通过 Labspec 5 软件进行去除背景操作(在每个生物学平行中,背景都随机采集了 3 个,这里取其平均值)、Get Zero 操作、基于面积的归一化处理操作,使获得的数据都进行归一化。

1.3.2 多变量数据分析 主要有主成分和线性判别分析(PC-LDA)、支持向量机分析(SVM)和相似性分析(ANO-SIM)3 种。主成分和线性判别分析是一种受监督的多变量分析方法,这种方法的应用能实现 2 个目的:(1)可直观显示各组别间有无明显差异,此处 PC-LDA 的功能与人们熟知的主成分分析(PCA)是一致的,都可以将其分值进行抽取、画图;(2)这种方法是一种受监督的方法,能够计算出 2 个组间差异的决定因素是什么,即差异的拉曼峰值是哪些。本试验中 PC-LDA 是在 R 2.15.0 版本中实现的。SVM 分析包括 2

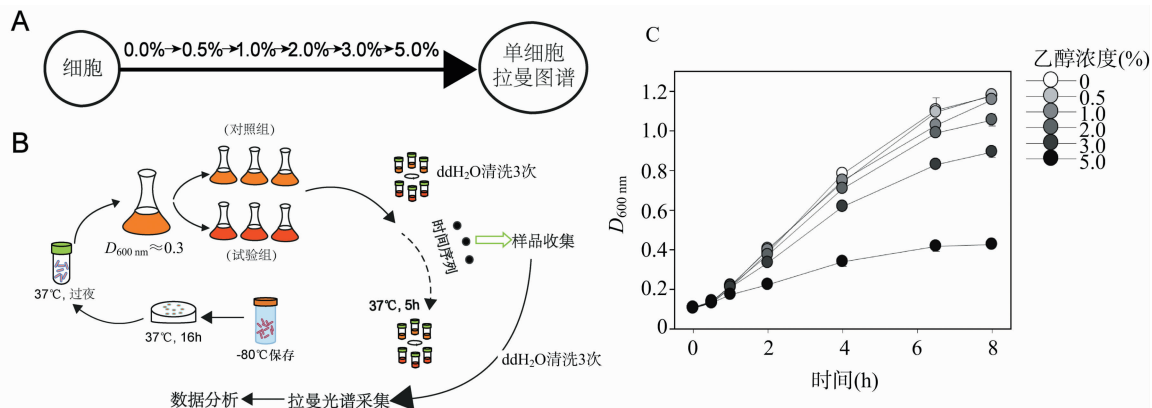
步:(1)通过训练数据集得到 1 个模型;(2)通过训练数据集构建的模型来对测试数据集进行预测。在第 1 步模型建立的时候有 2 个重要的参数: C 、 ν ,这 2 个重要的参数都是由模型自动选择的,选择的标准是模型通过交叉检验后错误率最低时的参数选择。相似性分析基于距离矩阵分析,能够通过比较组内、组间差异来解释对照组和处理组之间的拉曼光谱的相似性大小。

1.4 试验设计与流程

本研究的总体策略如图 1-A 所示,研究的定位主要依托于单细胞拉曼技术,以细胞应对乙醇刺激为核心,基于乙醇浓度的变化,追踪细胞表现的变化,通过考察不同浓度乙醇作用下的细胞反应,不仅能够反映单细胞拉曼技术的灵敏度,还能对细胞外在乙醇浓度进行准确预测。

基于以上研究策略及“1.1”“1.2”“1.3”节中叙述的具体试验流程,绘制试验流程(图 1-B)。

笔者设置了“1.1”节中的一系列乙醇浓度梯度对细胞进行刺激反应,这部分工作预期实现的目标是单细胞拉曼光谱的灵敏度。设置未对细胞生长造成抑制的乙醇浓度,如 0.5%、1.0%,但结果表明,即使是低浓度的乙醇刺激,细胞也会发生微小的代谢水平的变化(图 1-C)。



A—不同浓度乙醇刺激细胞的总体设计,通过对细胞实施不同浓度的乙醇刺激,监测单细胞拉曼光谱,获得单细胞反应信息;B—试验实施的具体流程;C—不同浓度乙醇刺激下细胞的生长曲线

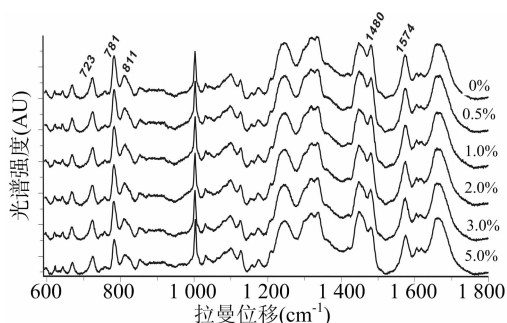
图1 试验的总体设计、流程及生长曲线

2 结果与分析

2.1 拉曼光谱表征的不同乙醇浓度下的细胞反应

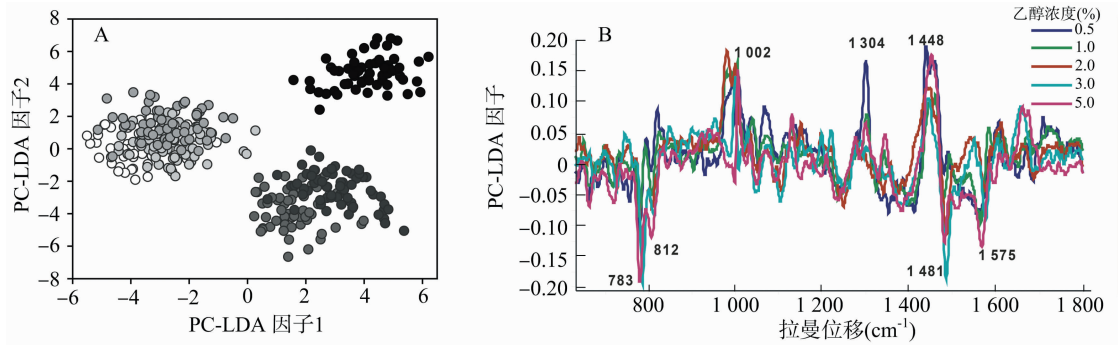
笔者选择了 1 种在 R 语言中可实现的、有监督的、结合主成分分析的线性判别分析方法,来展示、区分和解析乙醇处理组的细胞可否与对照组细胞相区别,以及哪些关键的拉曼峰值对这种区别有贡献。首先,通过拉曼光谱的比较发现,在乙醇刺激下,细胞的拉曼光谱之间是有差异的(图 2)。根据 PC-LDA 的结果(图 3-A),笔者发现,对照组细胞与乙醇处理的细胞都依次在 PC-LDA 因子 1 的方向上区别开来;可是对于 0.5%、1.0% 乙醇处理的细胞,即在生长曲线上没有显著差异的乙醇处理下,在 PC-LDA 因子 1 的方向上与对照组细胞非常接近,几乎聚在一起,但在 PC-LDA 因子 3 的方向上这 3 组细胞可以很明显地区分开来;对于 5.0% 乙醇处理的细胞,在 PC-LDA 因子 1 的方向上与 3.0% 乙醇处理的细

胞区分难度比较大,但在 PC-LDA 因子 2 的方向上的区分非常明显。无论在低浓度或是高浓度的乙醇作用下,单细胞拉曼光谱主要变化的峰值位置如图 3-B 所示,主要是表征核



每条图谱为 60 个单细胞拉曼光谱的平均值;各图谱右侧百分数为其对应的乙醇浓度

图2 不同浓度乙醇刺激下的拉曼光谱比较



A—PC-LDA 分值, 圆圈的颜色由浅入深分别对应的乙醇体积分数是 0%、0.5%、1.0%、2.0%、3.0%、5.0%; B—各乙醇刺激浓度下的 PC-LDA 因子, 表征的是不同乙醇刺激浓度下, 单细胞拉曼光谱发生变化的主要位置

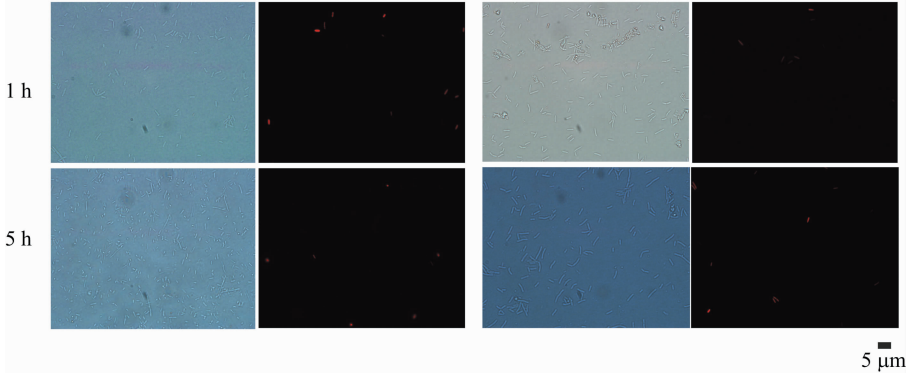
图3 不同浓度乙醇刺激下的 PC-LDA 分析结果

酸类物质的拉曼峰值(783、812、1 481、1 575 cm^{-1} 等)处的降低,在脂类(1 448 cm^{-1})、蛋白类(1 002 cm^{-1})物质处的拉曼峰值升高。说明细胞可能在应对乙醇刺激时,细胞膜有增厚的趋势,导致细胞中脂类明显升高。此外,细胞内核酸含量的减少,可能的原因是 RNA 的减少或是由于细胞体积增大而使得核酸呈现出稀释的作用,这是使表征核酸类物质的拉曼峰值降低的原因。

2.2 乙醇刺激下细胞的活性检测

用乙醇对细胞进行处理,从生长曲线角度来看,细胞生长变慢、细胞死亡也可能是细胞拉曼光谱发生变化的原因。因此,笔者主要对细胞在较高浓度乙醇(5.0%)处理下随时间

变化的活性来表征。结果表明,1 h 的乙醇刺激对细胞活性几乎没有影响。从 1 h 的对照组、刺激组的 PI 染色结果(图 4 - A)不难看出,在细胞死亡率方面,乙醇处理组的细胞并没有比对照组细胞的死亡率(百分之几的水平)明显提高,证明 1 h 内乙醇浓度为 5.0% 对于细胞活性没有明显伤害。当细胞经过 5 h 的乙醇处理时,细胞的死亡率略有升高,但总体来讲细胞致死率不是很高(图 4 - B)。本试验采用不同浓度的乙醇对细胞进行处理,大部分乙醇浓度低于 5.0%,且本试验中所采用的刺激时间很短,为 0.5 h,所以基本可以忽略细胞活性受到乙醇影响。因此可以得出,细胞拉曼光谱的变化确实是在乙醇作用下细胞代谢层面的生理变化。



A. 对照组细胞不同时间的 PI 染色结果 B. 5.0%乙醇刺激下细胞的 PI 染色结果
图4 高浓度(5.0%)乙醇刺激浓度下细胞活性的 PI 染色结果

2.3 基于单细胞拉曼光谱的乙醇浓度预测

采集用不同浓度乙醇处理后各细胞的拉曼光谱,用多变量分析方法能够对其进行区分。笔者采用 SVM 分析,将不同浓度乙醇处理下的单细胞拉曼光谱混在一起,并随机抽取 15 个细胞作为测试数据集,剩余的 45 个细胞作为训练数据集。最终结果表明,经过不同浓度乙醇处理的细胞都能够实现其各自组别 90% 以上的区分正确率(表 1)。

此外,根据细胞的指纹光谱,比较乙醇处理组细胞与对照组细胞之间的差异,笔者采用相似性分析的方法(ANOSIM; 基于 Jensen - Shannon Divergence 距离矩阵; permute = 999)。这种相似性分析经常被应用于宏基因组分析中,但单细胞拉曼光谱由于其光谱峰值数量巨大而且不同组别含有大量不同的单个细胞等,很适合采用多变量方差分析的方法对拉曼数据进行分析,而相似性分析在计算处理组与对照组之间差异

表 1 不同浓度乙醇刺激下细胞反应的区分和预测结果			
乙醇浓度 (%)	SVM	ANOSIM	
	分类率	P 值	R 值
0.5	0.94 ± 0.06	0.001	0.11
1.0	0.94 ± 0.05	0.002	0.07
2.0	0.96 ± 0.05	0.001	0.27
3.0	0.94 ± 0.06	0.001	0.34
5.0	1.00 ± 0.00	0.001	0.54

注:Pearson 相关 $R^2 = 0.96$ 。SVM 用于预测,ANOSIM 用于区分。

方面有特长。结果表明,采用低浓度乙醇处理的细胞与对照组细胞之间存在较为微小的差异(R 值越接近 0,证明差异越小;越接近 1,证明差异越大),但这种差异为极显著差异($P <$
(下转第 284 页)

4.3 提升农田基础设施水平

加强基础设施建设,提高山药种植基地的生产能力是推动和促进丰县山药产业发展的基础保障。重点加强 4 个方面的基础设施建设:一是加强山药规模化种植基地农田基础设施建设,加强山药种植基地的微喷滴灌等节水灌溉设施建设,提升生产基地的灌排能力,确保生产基地达到“早能灌,涝能排”的高产农田标准;二是加强山药规模生产基地的田间道路建设,确保基地产品全天候对外运输;三是加强山药规模生产基地的配套大棚、冷库等辅助设施建设,确保生产基地产品保存、处理和育苗的需要;四是加强山药规模生产基地农田林网等防护条件建设,提高生产基地生产保障能力。

4.4 培植山药产业化龙头企业

培育现代山药高效特色产业,必须依靠产业化龙头企业,根据该地区山药产业发展现状,应着重促进产品销售为主的三类产业化龙头企业,改变山药销售以“经纪人”为主渠道的现状。

4.4.1 营销企业 积极推动和发展“农超对接”产品销售体系,通过建立规模化种植基地+企业的产业模式,推动企业为主导的产品种植、收购和保鲜初加工、物流配送产品销售体系;构建规模化种植基地+企业的产业模式,形成“互联网+山药”的现代农产品线上营销体系,建设产品种植、收购和保鲜初加工、物流配送的线下产品销售体系,形成覆盖一定地区山药生产的现代化农产品销售企业。

4.4.2 出口企业 引进农产品外贸企业建立规模化种植基

地+企业的保鲜加工、出口销售的产品出口销售体系,形成覆盖一定地区山药生产的外向型农产品销售企业。

4.4.3 深加工企业 引进和新建山药深加工企业,加强以山药产品为主的营养保健品的科学加工技术研发,发挥山药的营养保健功能,建立规模化种植基地+企业的产品种植、收购和深加工产业化体系,形成覆盖一定地区山药生产的现代化农产品加工企业。

参考文献:

- [1] 赵成义,于启建,谭立星,等. 丰县蔬菜产业发展现状、存在的问题及对策[J]. 安徽农学通报,2013,19(10):62-63.
- [2] 侯宗海,渠立强,朱显忠,等. 丰县土壤养分含量状况与分析[J]. 现代农业科技,2011(13):264-265.
- [3] 周志林,唐君,史新敏,等. 6 个不同类型山药品种引种鉴定及特色品种筛选[J]. 江西农业学报,2010,22(5):66-67.
- [4] 史新敏,周志林,唐忠厚,等. 江苏省淮山药生产现状与产业发展[J]. 江苏农业科学,2010(5):527-528.
- [5] 韩晓勇,闫瑞霞,殷剑美,等. 铁棍山药组织培养快繁及试管芽离体再生体系研究[J]. 西北植物学报,2013,33(10):2120-2125.
- [6] 殷剑美,闫瑞霞,韩晓勇,等. 秸秆套网袋栽培对紫山药产量及品质的影响[J]. 浙江农业学报,2014,26(1):61-66.
- [7] 刘庞源,宋曙辉,张宝海,等. 紫山药种质资源的引进和栽培技术[J]. 中国蔬菜,2011(13):45-46.

(上接第 264 页)

0.01)。说明采用低浓度的乙醇处理细胞,细胞拉曼光谱有明显变化,但反应程度较小;而采用较高浓度的乙醇处理细胞,如体积分数为 5.0%,细胞反应极显著而且剧烈($P < 0.01$; $R = 0.54$)。同时,由相似性分析得到的细胞反应程度(R 值)与乙醇浓度之间呈现很强的线性相关(皮尔森系数为 0.96)。这说明,根据细胞在不同浓度乙醇中的单细胞拉曼光谱变化情况,可以对细胞外环境中乙醇浓度进行预测。与传统的乙醇试剂盒相比,这种方法不仅可以提供乙醇的浓度信息,还能提供细胞代谢层面的变化信息。

3 结论

目前在单细胞水平研究细胞的刺激反应的方法是非常有限的,本研究中介绍的单细胞拉曼技术结合显微操作技术,是一种非标记的、不依赖于群体细胞的研究,并且其独特的灵敏性使之具有更广阔的应用前景。在本研究中,以乙醇作为刺激物,通过设置一系列浓度的刺激,监测不同浓度乙醇处理下细胞的单细胞拉曼光谱变化,从而对细胞的反应进行表征。通过结合多变量分析,使得单细胞拉曼光谱表征的细胞刺激反应更具统计意义。但是,单细胞拉曼光谱表征细胞应激反应在精度上是有待提高的,不能精细地表征细胞内特定成分的变化,须要与其他方法联用。但本方法是一种新颖、独特、灵敏的检测细胞应激乙醇的代谢物反应,并且可以对胞外乙醇浓度进行有效地预测,同时对其他环境刺激物的监测也具有指导作用。

参考文献:

- [1] Balat M, Balat H. Recent trends in global production and utilization of bio-ethanol fuel[J]. Applied Energy, 2009, 86(11):2273-2282.
- [2] Soufi B, Krug K, Harst A, et al. Characterization of the *E. coli* proteome and its modifications during growth and ethanol stress[J]. Frontiers in Microbiology, 2015, 6(2):218-222.
- [3] Chong H Q, Huang L, Yeow J W, et al. Improving ethanol tolerance of *Escherichia coli* by rewiring its global regulator cAMP receptor protein (CRP)[J]. PLoS One, 2013, 8(2):e57628.
- [4] Kasavi C, Eraslan S, Arga K Y, et al. A system based network approach to ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. BMC Systems Biology, 2014, 8(1):22536-22553.
- [5] Lin L, Ji Y T, Tu Q C, et al. Microevolution from shock to adaptation revealed strategies improving ethanol tolerance and production in *Thermoanaerobacter*[J]. Biotechnology for Biofuels, 2013(6):103.
- [6] Yang H S, Giannone R J, Dice L, et al. *Clostridium thermocellum* ATCC27405 transcriptomic, metabolomic and proteomic profiles after ethanol stress[J]. BMC Genomics, 2012, 13(1):1-17.
- [7] Zu T N K, Athamneh A I M, Wallace R S, et al. Near-real-time analysis of the phenotypic responses of *Escherichia coli* to 1-butanol exposure using Raman spectroscopy[J]. Journal of Bacteriology, 2014, 196(23):3983-3991.
- [8] Long F, Zhu A, Shi H C. Recent advances in optical biosensors for environmental monitoring and early warning[J]. Sensors, 2013, 13(10):13928-13948.