

# 利用流式细胞仪分选土壤中发生自然转化的阳性转化子

王玉萍 黄巧云 陈雯莉

华中农业大学农业微生物学国家重点实验室, 武汉 430070

**摘要** 为确定土壤中的 DNA 通过自然转化的方式发生水平基因转移的频率, 将 1 个带有 *egfp* 和卡那霉素抗性基因 *Kan<sup>r</sup>* 的质粒 DNA 添加到自然土壤中, 分离菌悬液, 上流式细胞仪分选能发出绿色荧光且具有卡那霉素抗性的阳性转化子, 确定土壤中发生自然转化的频率小于  $10^{-7}$ 。分离的菌悬液通过培养基的富集, 从 39 736 426 个细胞中分选获得了 82 个细胞, 最终得到了纯化的阳性转化子, 证实土壤中的 DNA 通过自然转化发生了水平基因转移。

**关键词** 水平基因转移; 自然转化; 阳性转化子; 流式细胞术; 分选

**中图分类号** S 151.9 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2016)02-0056-07

自然界中水平基因转移(horizontal gene transfer, HGT)有多种途径, 包括转化、转导和接合。转化一般是指某一种基因型的细胞从周围介质中吸收另一基因型细胞游离 DNA, 从而使受体的基因型和表型发生相应变化的现象<sup>[1]</sup>。过去人们一直认为细胞死亡或者通过代谢释放的 DNA 很快会被环境中的核酸酶降解, 因此, 环境中作为水平基因转移方式之一的转化与转导和接合作用相比, 显得无关紧要。但是, 最近大量研究表明, 不同生物释放到环境中的 DNA 能被环境中的固体颗粒吸附固定、抗核酸酶的降解、在自然环境中持久存在, 并且能被某些合适的宿主细胞所接受<sup>[2]</sup>。

近年来, 自然环境中细菌水平基因转移得到了科学家的重视。关于 HGT 探测方法的研究也有了很大进展, 主要包括经典的微生物学平板培养法和现代分子生物学方法。经典的微生物培养法是根据目标基因的特性, 确定合适的培养基, 在带有选择性标记的平板上检测 HGT 的发生, 这种方法能够简单快速地检测 HGT, 但不能准确获得基因水平转移的频率。而分子生物学方法, 则可以将编码 GFP (绿色荧光蛋白) 的功能基因插入到已知质粒上, 通过质粒转移在受体菌中表达 *gfp* 基因, 利用荧光显

微镜就能够直接观察并比较准确地计量环境中的转化子<sup>[3]</sup>。

但截至目前还没有明确的实验数据确定 DNA 在土壤中通过自然转化方式发生水平基因转移的频率。

流式细胞术(flow cytometry, FCM)是一种可以对处在液流中的单个细胞或其他生物颗粒等进行快速定量分析和分选的技术<sup>[4]</sup>。流式细胞术依赖于能实现高精密度分析和高速细胞分选的流式细胞仪, 采用美国贝克曼库尔特公司生产的 MoFloXDP 流式细胞仪能从未知细胞群体中高速分选出目标细胞, 为进一步的功能研究或细胞培养提供材料, 因其具有分选速度可达每秒 30 000 个、精度高、准确性好等优点, 成为当代最先进的细胞定量分选技术<sup>[5]</sup>。FCM 主要依据细胞的物理或化学特性, 如细胞大小、细胞表面特异性表达的蛋白等进行分析 and 分选。90°侧散射光的光强与细胞内部颗粒紧密相关, 前向角散射光的光强则和细胞大小尺寸有关<sup>[6]</sup>, 但流式细胞仪对细胞形态的分辨率为 0。目前国内外几乎没有关于分选低于 0.1% 比例样品的报道。本研究将一个带有 *egfp* 和卡那霉素抗性基因 *Kan<sup>r</sup>* 的质粒 DNA 添加到自然土壤中, 旨在利用流式细胞术确定

收稿日期: 2015-03-03

基金项目: 国家自然科学基金项目(41071180, 41230854); 国家“863”计划项目(2012AA101402)

王玉萍, 硕士研究生, 研究方向: 环境微生物, E-mail: 644938272@qq.com

通信作者: 陈雯莉, 博士, 教授, 研究方向: 环境微生物, E-mail: wlchen@mail.hzau.edu.cn

土壤中的DNA通过自然转化发生水平基因转移的频率。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1)材料。质粒pmTn-RKG由笔者所在实验室郑名府构建,该质粒含有卡那霉素(Kan<sup>r</sup>)和氨苄青霉素(Amp<sup>r</sup>)抗性,含有绿色荧光标记基因 $egfp$ 和高效转座酶基因 $mTnp$ 。所用土壤采自华中农业大学旁边的菜园中。

2)仪器。分选型流式细胞仪(MoFlo XDP,美国贝克曼库尔特公司),正置荧光显微镜(Axioimager A1,德国Carl Zeiss公司)。

3)试剂。鞘液购自美国贝克曼库尔特公司,卡那霉素购自美国Sigma公司。 $Na_4P_2O_7 \cdot 10H_2O$ 、碘海醇购自国药集团化学试剂有限公司。

4)培养土壤细菌的培养基。牛肉膏蛋白胨培养基和土壤浸提液培养基。牛肉膏蛋白胨培养基配制:称取蛋白胨10g,牛肉浸膏5g,氯化钠5g,调整pH至7.2~7.4,加水定容至1L,121℃灭菌30min。若需要固体培养基,则向其中添加1.5%的琼脂。土壤浸提液培养基配制:称取100g土样加入200mL水,水浴搅拌30min,用4层纱布过滤,9100r/min离心10min,取出上清,9100r/min离心10min,用0.22μm滤膜过滤,加水定容至1L,115℃灭菌20min。若需要固体培养基,则向其中添加1.5%的琼脂。

### 1.2 土壤自然转化样品的处理

自然转化的样品放置在50mL离心管中。称取10g菜园土,向土壤中添加抽提的质粒pmTn-RKG DNA,使DNA终质量分数为1μg/g。用涡旋仪将样品混匀,放在28℃培养箱中。

### 1.3 土壤自然转化样品中细菌的分离

1a后,从土壤自然转化样品中称取0.3g,加入600μL TTSP(50mmol/L  $Na_4P_2O_7 \cdot 10H_2O$ , 0.05% Tween 80)溶液,涡旋仪上涡旋1min,超声波清洗仪破碎10min。在一个新的离心管中先加入90μL碘海醇(80%),转移180μL土壤上层悬液加至碘海醇溶液,10200r/min离心10min。转移180μL包含细菌的上层和中层悬液到一个新的离心管中,加入1320μL TTSP溶液混匀,7200r/min离心10min。丢弃上层的1200μL液体,将细胞悬浮在剩余的300μL液体中即成土壤菌悬液。

### 1.4 样品上流式细胞仪分选的预处理

1)土壤菌悬液直接上流式细胞仪分选的预处理。将本文“1.3”分离的土壤菌悬液在超净台中用40μm的细胞滤网过滤,7200r/min离心5min,弃上清,加入PBS重悬,7200r/min离心5min,重复洗涤3次,最后将菌液重悬在PBS溶液中。

2)土壤菌悬液在培养基中转接富集1次后上流式细胞仪的预处理。将本文“1.3”分离的土壤菌悬液按10%的比例分别转接到牛肉膏蛋白胨培养基(Kan<sup>r</sup>)和土壤浸提液培养基(Kan<sup>r</sup>)中,28℃180r/min振荡培养,2d后按10%的比例转接1次。通过转接去除土壤颗粒、不可培养的微生物和不含卡那霉素抗性的细菌。增大分选时样品中可培养的阳性转化子的比例,最后收集菌体,重复同样操作。

### 1.5 流式细胞仪分选阳性转化子

1)流式细胞仪调试。选用70μm喷嘴。开机后,打开主液流断点窗口,点击主液流,调节振幅,使液流断点位于窗口的上1/2~1/3之间,保证主液滴各滴形状规则。液流稳定后,打开侧液流窗口的电压,激活Test Sort(分选测试)。小心调整侧液流窗口中的振幅,使液流分束。根据分选目标细胞的需要,安装分选装置。返回上一窗口,点击震荡,等待仪器自动计算液滴延迟时间<sup>[7]</sup>。

2)分选。阳性转化子的分选在美国贝克曼库尔特公司MoFlo XDP流式细胞仪上进行。实验操作及结果导出由软件Summit v5.3(Dako Colorado Inc.)控制。吸收波长为488nm,以(525±29)nm的激发光参数测定绿色荧光蛋白激发荧光的强度,以侧向角散射光(SSC)测定细胞的颗粒密度大小和结构复杂度。样品测试前,先用标准荧光微球校准仪器,使其在一定的阈值内分选效率最高。鞘液罐、流室及有关通道先用75%乙醇灭菌,再用无菌鞘液洗去乙醇。以不发绿色荧光的菌株DH5α为阴性对照,以发出绿色荧光的菌株DH5α-pXr为阳性对照建立分选门。和阴性对照相比,待分选的阳性转化子细胞会在FL1通道检测到强烈的发射光<sup>[7]</sup>。通过适当的设门,去除杂质、死细胞、阴性细胞,分选能发出绿色荧光的阳性转化子。分选速度为每秒5000~10000个细胞。

3)土壤菌悬液直接上流式细胞仪的分选。将处理好的土壤菌悬液分选到牛肉膏蛋白胨培养基(Kan<sup>r</sup>)和土壤浸提液培养基(Kan<sup>r</sup>)固体平板上。每个平板以6×6矩阵方式分选36个细菌,每平板

3 个重复。放在 28 ℃ 培养箱中培养。鉴定长出的单菌落是否发出绿色荧光,是否是阳性转化子。

4) 土壤菌悬液在培养基中转接富集 1 次以后上流式细胞仪分选。将在培养基中富集转接 1 次以后预处理好的样品,上流式细胞仪分选阳性转化子到 5 mL 液体培养基( $\text{Kan}^r$ )中,28 ℃、180 r/min 振荡培养。当菌液变浑浊时,在超净台上取出部分菌液在荧光显微镜下镜检,观察菌液中是否有发出绿色荧光的细菌。

在荧光显微镜下观察到菌液中有细菌发出绿色荧光时,再次上流式细胞仪分选,将阳性转化子分选到 96 孔板和固体平板上( $\text{Kan}^r$ )。96 孔板上的对照有:培养基、LB +  $\text{Kan}^r$ 、DH5 $\alpha$  (LB)、DH5 $\alpha$ -pXr (LB+ $\text{Kan}^r$ )。将分选后的 96 孔板和固体平板放在 28 ℃ 培养箱中培养。

2~3 d 后,将 96 孔板样品放在酶标仪上检测荧光值,与正负对照菌株的荧光值相比较,挑选部分可能发出绿色荧光的菌株,划线纯化出单菌落。

根据平板上长出单菌落的大小、形态、颜色、光滑度的不同,挑选部分形态差异较大的单菌落到 96 孔板中(对照同上),放在 28 ℃ 培养箱中培养。2~3 d 后,将 96 孔板样品放在酶标仪上检测荧光值,根据上述方法挑选部分菌株,划线纯化出单菌落。

### 1.6 分选出的阳性转化子的鉴定

1) 分选出的转化子在荧光显微镜下镜检。挑取纯化得到的阳性转化子的单菌落到 PA 瓶中,含 2 mL 牛肉膏蛋白胨液体培养基( $\text{Kan}^r$ ),28 ℃、180 r/min 振荡过夜培养,取部分菌液到 2 mL 离心管中,7 200 r/min 离心 5 min,在荧光显微镜下镜检确认这些转化子是否发出绿色荧光。

2) 分选的阳性转化子菌液 PCR 扩增基因 *egfp*。以纯化出的阳性转化子的新鲜菌液为模板进行基因 *egfp* 的 PCR 扩增。PCR 扩增上游引物 5'-TGCT-TCAGCCGCTACCCC-3', 下游引物 5'-AGCTCGTCCATGCCGAGA-3', PCR 产物长度为 500 bp。PCR 扩增体系:19.8  $\mu\text{L}$  超纯水,0.5  $\mu\text{L}$  (50 ng/ $\mu\text{L}$ ) 上游引物,0.5  $\mu\text{L}$  (50 ng/ $\mu\text{L}$ ) 下游引物,0.5  $\mu\text{L}$  (10 mmol/L) dNTP,1  $\mu\text{L}$  模板,0.2  $\mu\text{L}$  *Taq* 酶,2.5  $\mu\text{L}$  10 倍缓冲液。PCR 扩增程序:94 ℃ 预变性 5 min;94 ℃ 变性 30 s,60 ℃ 退火 0 s,72 ℃ 延伸 30 s,32 个循环;72 ℃ 延伸 10 min。PCR 结束后用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物。

3) 阳性转化子的 16S rRNA 基因测序。以分选

纯化的能发出绿色荧光的阳性转化子的菌液为模板,PCR 扩增 16S rRNA 基因。使用通用引物 27F 和 1492R,PCR 产物长度约 1 500 bp。PCR 扩增体系:19.8  $\mu\text{L}$  超纯水,0.5  $\mu\text{L}$  (50 ng/ $\mu\text{L}$ ) 上游引物 (27F),0.5  $\mu\text{L}$  (50 ng/ $\mu\text{L}$ ) 下游引物 (1492R),0.5  $\mu\text{L}$  (10 mmol/L) dNTP,1  $\mu\text{L}$  模板,0.2  $\mu\text{L}$  *Taq* 酶,2.5  $\mu\text{L}$  10 倍缓冲液。PCR 扩增程序:94 ℃ 预变性 5 min;94 ℃ 变性 30 s,55 ℃ 退火 30 s,72 ℃ 延伸 90 s,32 个循环;72 ℃ 延伸 10 min。PCR 结束后用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物。

将剩余的 PCR 扩增产物送交生物公司测序。将完整的 16S rRNA 基因序列在 NCBI 数据库中进行比对。通过 MEGA5 软件使用邻接法构建进化树。用自举法 1 000 次重复测试进化树的置信度。

## 2 结果与分析

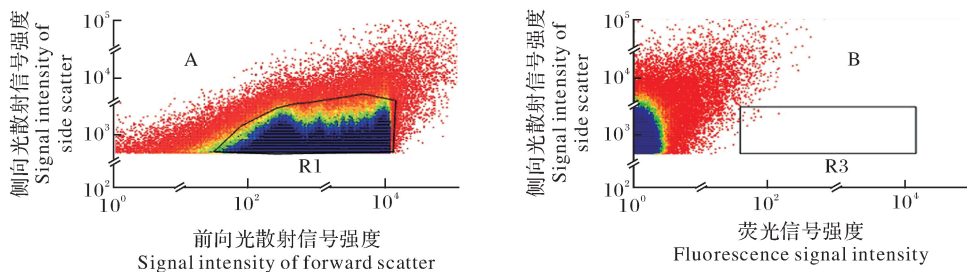
### 2.1 土壤菌悬液直接上流式细胞仪分选的结果

分离的土壤菌悬液设 R1(图 1A)和 R3(图 1B)分选门分选到牛肉膏蛋白胨培养基( $\text{Kan}^r$ )和土壤浸提液培养基( $\text{Kan}^r$ )的固体平板上。由表 1 可知:直接分离的土壤菌悬液从 70 751 053 个细胞中分选了 108 个细胞到牛肉膏蛋白胨培养基( $\text{Kan}^r$ )固体平板上,最终长出了 7 个单菌落;直接分离的土壤菌悬液从 16 160 013 个细胞中分选了 108 个细胞到土壤浸提液培养基( $\text{Kan}^r$ )固体平板上,最终长出了 4 个单菌落。11 个单菌落占分出细胞总数的 5.1%。挑出这 11 个单菌落在荧光显微镜下镜检,结果都不发绿色荧光,确定这 11 个细菌中都没有 *egfp* 基因,不是阳性转化子,舍弃。对于土壤自然转化样品,从 1 000 万以上个细胞中都没有分选出能发出绿色荧光的阳性转化子,表明采用本方法检测到的质粒 DNA 在土壤中发生自然转化的频率小于  $10^{-7}$ 。

### 2.2 土壤菌悬液在培养基中富集 1 次以后上流式细胞仪分选的结果

1) 在牛肉膏蛋白胨培养基( $\text{Kan}^r$ )中转接富集 1 次以后第 1 次分选结果。土壤菌悬液在牛肉膏蛋白胨培养基( $\text{Kan}^r$ )中转接富集 1 次预处理以后的样品,上流式细胞仪分选,分选 R1 和 R3 的细菌到 5 mL 牛肉膏蛋白胨液体培养基( $\text{Kan}^r$ )中。R3 门里的细胞占细胞总数不到 0.01%。由表 1 可知:从 39 736 426 个细菌中分选出了 82 个目的细菌。将分选出的样品放在 28 ℃ 摇床中,180 r/min 振荡培养。2 d 后菌液变浑浊,取部分菌液在荧光显微镜





A. 土壤悬液细胞前向光散射对侧向光散射散点图 Dot plots of forward scatter vs. side scatter of soil bacteria;B. 土壤悬液细胞荧光强度对侧向光散射散点图 Dot plots of fluorescence vs. side scatter of soil bacteria.

图 1 土壤菌悬液含绿色荧光细胞流式细胞仪分选

Fig.1 Flow cytometric analysis and sorting of green fluorescence cells from soil bacterial suspension

表 1 土壤菌悬液直接上流式细胞仪及在培养基中转接富集 1 次以后上流式细胞仪分选统计结果

Table 1 Results of flow cytometry sorting for directly isolated and one time-enriched soil bacteria

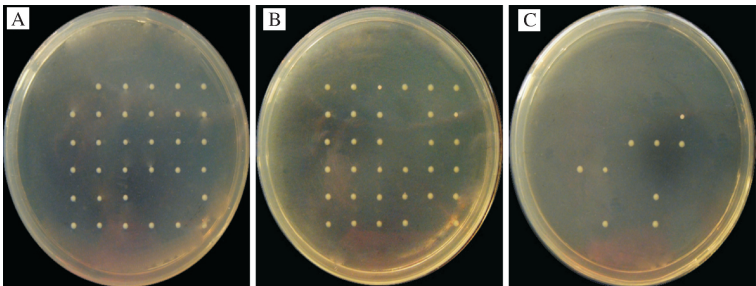
分选方法 Sorting method	固体平板(Kan <sup>r</sup> , 3 个重复) Solid plate(Kan <sup>r</sup> , 3 replications)	分选总数目 Total	分选数目 Sorted cell	单菌落或纯化转化子数 No. of single colony or purified transformants
直接分选 Direct sorting	牛肉膏蛋白胨培养基 Beef extract peptone medium	70 751 053	108	7
	土壤浸提液培养基 Soil extract medium	16 160 013	108	4
	牛肉膏蛋白胨培养基 Beef extract peptone medium	39 736 426	82	12
富集 1 次后分选 Sorting after on time-enrich	土壤浸提液培养基 Soil extract medium	46 788 237	19	0

下镜检,在白光视野下观察到很多细菌,在对应的荧光视野下观察到有部分细菌发出绿色荧光。

2) 在牛肉膏蛋白胨培养基(Kan<sup>r</sup>)中转接富集 1 次以后第 2 次分选结果。第 2 次分选 1:将上述菌液再次进行分选,发现 R3 门里有一群细菌,与正对照 DH5α-pXr 重合,R3 门里的细胞占细胞总数的 17.87%。分选 R1 和 R3 门里的细菌到 96 孔板上,每个孔中含 200 μL 牛肉膏蛋白胨培养基(Kan<sup>r</sup>),

设置的对照孔:牛肉膏蛋白胨培养基(Kan<sup>r</sup>)、LB+ Kan<sup>r</sup>、DH5α(LB)、DH5α-pXr(LB+ Kan<sup>r</sup>)。将 96 孔板放在 28℃培养箱中培养。

第 2 次分选 2:按荧光强度分为 3 个区域 R3、R4、R5,分选时设门标记:1(R1、R3)、2(R1、R4)、3(R1、R5)。每个平板以 6×6 矩阵方式分选 36 个细菌,然后将固体平板放在 28℃培养箱中培养,结果如图 2 所示,平板上总共长出了 75 个单菌落,细菌

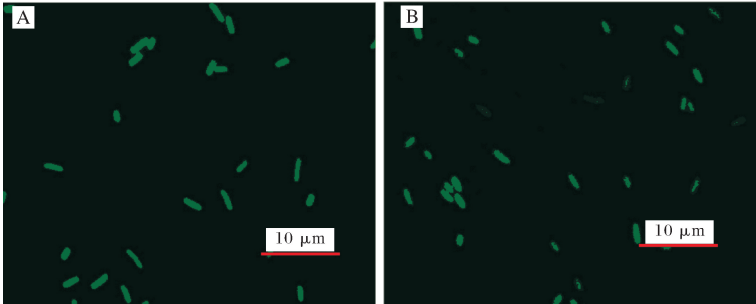


A. 分选范围:R1×R3 Sorting range R1×R3;B. 分选范围:R1×R4 Sorting range R1×R4; C. 分选范围:R1×R5 Sorting range R1×R5.

图 2 流式细胞仪分选出含绿色荧光细胞培养于牛肉膏蛋白胨培养基

Fig.2 Green fluorescence cells growing on beef extract-peptone agar after flow cytometric analysis and sorting  
的成活率为 69.4%。  
从 3 个平板上挑取纯化的单菌落标记为:L-7, 从 96 孔板上挑取纯化的单菌落标记为:K-A1, L-10,L-15,L-17,L-28。 K-B1,K-B12,K-C4,K-C5,K-C7,K-C12。  
3)在培养基中转接富集 1 次以后上流式细胞仪

分选的统计结果。由表 1 可知:分离的土壤菌悬液在牛肉膏蛋白胨培养基(Kan<sup>r</sup>)中转接富集 1 次以后,从 39 736 426 个细胞中分选了 82 个细胞,最终纯化出了 12 株阳性转化子。分离的土壤菌悬液在土壤浸提液培养基(Kan<sup>r</sup>)中转接富集 1 次以后,从 46 788 237 个细胞中分选了 19 个细胞,最终没有分选纯化出阳性转化子。

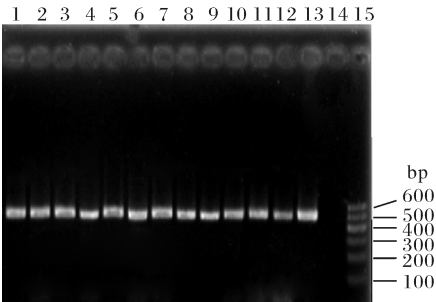


A. K-B12; B. L-7.

图 3 部分阳性转化子荧光显微镜照片示例

Fig. 3 Examples of fluorescent photograph of positive transformant

2)分选的阳性转化子菌液扩增基因 *egfp* 的结果。以纯化出的阳性转化子的菌液为模板 PCR 扩增基因 *egfp*,结果如图 4 所示。这 12 个样品都扩增出了目的条带,都含有基因 *egfp*,是阳性转化子。



1~12. 阳性转化子;13. 正对照;14. 负对照;15. Marker I。  
1-12. Positive transformants; 13. Positive control; 14. Negative control; 15. Marker I.

图 4 以分选的阳性转化子菌液为模板 PCR 扩增基因 *egfp*

Fig. 4 The positive transformants bacteria was amplified gene *egfp* by PCR

3)分选的阳性转化子 16S rRNA 测序结果。将阳性转化子送公司测定 16S rRNA 序列,在 NCBI 上比对的结果(表 2)显示,这 12 个阳性转化子与 *Escherichia fergusonii* ATCC 35469 和 *Shigella sonnei* strain CECT 4887 有最高的同源性。选择相关菌株构建进化树,一部分基于亲缘相关性,通过序列比对,数据库查找,选取 10 株与上述菌株同源性最近的菌株进行比对。另一部分依据功能相关性,

2.3 分选出的阳性转化子的鉴定结果

1)分选的阳性转化子在荧光显微镜下镜检结果。部分菌株的荧光显微照片如图 3 所示。样品 K-B12 菌体较长较细,3~5 μm,发出的荧光较强。样品 L-7 菌体较短较粗,2~3 μm,发出的荧光较弱。经鉴定分选纯化的 12 个样品都发出绿色荧光,确定都是阳性转化子。

通过查寻水平基因转移相关文献,选取 10 株已证实具有转移能力、但与上述菌株同源性较远的菌株,如流感嗜血杆菌(*Haemophilus influenzae*)、枯草芽胞杆菌(*Bacillus subtilis*)等,作为对照菌株。最后将这两部分菌株连同笔者所在实验室所获得的菌株,用邻接法构建进化树(图 5),结果显示:这些阳性转化子与宋内志贺氏菌属和弗格森大肠埃希氏菌属紧密相关,说明质粒 DNA 通过自然转化的方式水平基因转移到了弗格森大肠埃希氏菌属和宋内志贺氏菌属中。

表 2 阳性转化子 BLAST 比对同源性最高菌株统计结果

Table 2 BLAST results of positive transformants

分选的阳性转化子种属名称 Positive transformants genus	分选的阳性转化子及编号 Positive transformants name				
弗格森大肠埃希氏菌 <i>Escherichia fergusonii</i> ATCC 35469	K-A1	K-B12	K-C5	K-C7	K-C12
	L-7	L-15	L-17	L-28	
宋内志贺氏菌 <i>Shigella sonnei</i> strain CECT 4887	K-B1	K-C4			
	L-10				

3 讨论

本研究将质粒 DNA 直接添加到自然土壤中,通过流式细胞仪检测 DNA 发生自然转化的频率,土壤菌悬液直接上流式细胞仪分选结果显示,从 1 000 万以上个细胞中都没有分选出能发出绿色荧

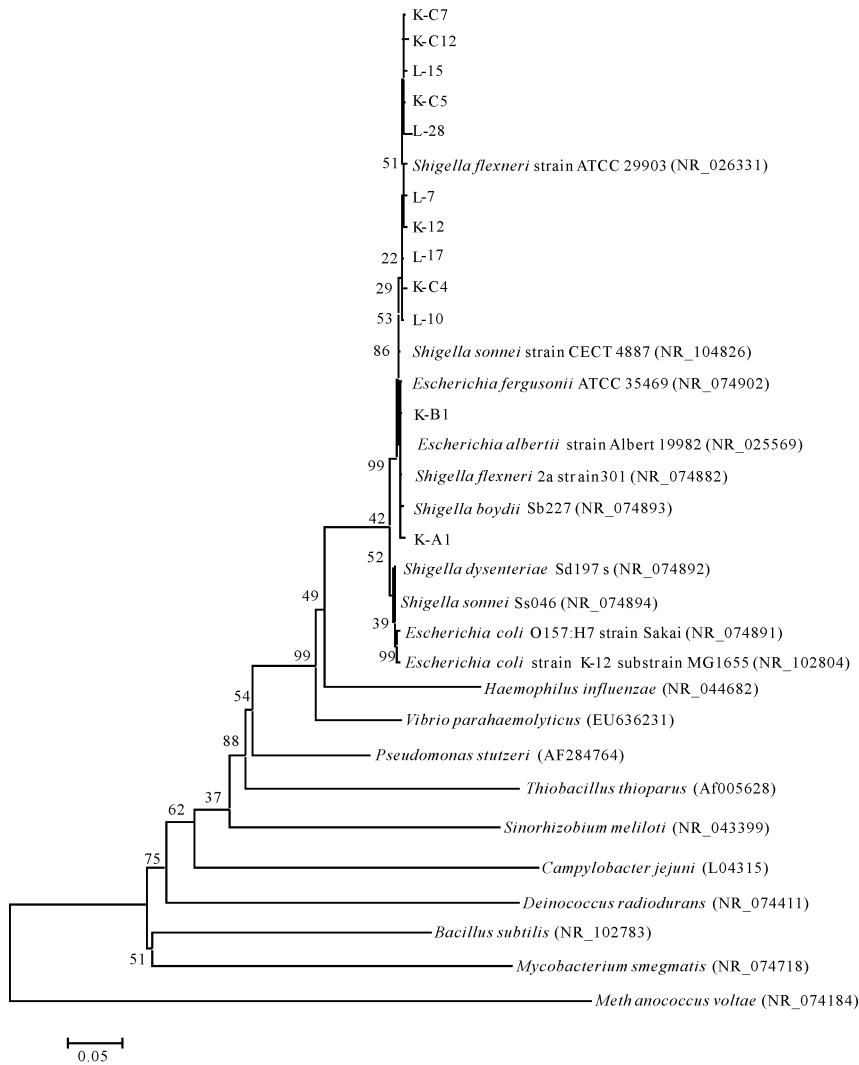


图 5 分选的阳性转化子 16S rRNA 序列构建的进化树

Fig. 5 Phylogenetic tree of positive transformants

光的阳性转化子。说明采用本方法检测到的质粒 DNA 在土壤中发生自然转化的频率低于  $10^{-7}$ ，分析其原因可能是：(1) 土壤中可培养的微生物小于 10%，若质粒转移到不可培养细菌中，即使采用流式细胞仪分选出来了，在培养基上也无法生长，因此，长出单菌落占分选总数的 5.1%；(2) 流式细胞仪分选时流速非常快，有些细胞直接打到平板上，会造成细胞损伤而死亡；(3) 流式细胞仪只能识别荧光信号，土壤菌悬液中有些土壤颗粒也能发出绿色荧光，属于假阳性，因此，分选出来的有可能是不能培养的细胞、死细胞、细胞碎片或其他土壤颗粒等。

分离的土壤菌悬液通过在培养基中转接富集 1 次以后，再通过流式细胞仪检测 DNA 发生自然转化的频率，最终从 39 736 426 个细胞中分选出了能发出绿色荧光且带有卡那霉素抗性的阳性转化子，

证明 DNA 确实发生了自然转化。

当质粒 DNA 在土壤中被降解为小的片段，即使被感受态细胞吸收了，如果没有卡那霉素抗性、不能发出绿色荧光，用本研究的方法就无法识别出来，因此，本研究检测的转化频率可能与实际有偏差。后期可以结合基因组测序、Western Blot 等方法进一步检测土壤中发生的自然转化现象。

本研究从 39 736 426 个细胞中分选了 82 个细胞，阳性率约为  $2 \times 10^{-6}$ 。由于具有高速分析大量细胞的能力，流式细胞仪极其适用于分选低比例罕见细胞的操作。即便如此，当这一比例低至  $10^{-6}$  量级时，还是有诸多障碍需要克服，如非特异性细胞的干扰、自发荧光对标记基因荧光的干扰以及仪器本身的背景噪音等<sup>[8-9]</sup>。而本研究则采取多次富集、分步分选的策略来克服低比例细胞分选中可能带来的

分选结果纯度过低问题,结果显示第 1 次分选阳性率小于 0.01%,通过富集培养后,再进行第 2 次分选,此时阳性率已达 17.87%。通过 2 次分选,提高了样品中的阳性率,为最终通过培养方法纯化出阳性转化子提供了基础保证。

用流式细胞仪分选阳性转化子的关键点在于:(1)整个检测过程中用到的 PBS 溶液都要经过滤膜过滤,洗涤细菌细胞后低速离心收集,避免细胞悬液中存在的杂质后期堵塞流式细胞分选管。(2)细胞悬液不能放置太久,应尽快分选。如果放置时间太长,容易形成团块,故上样前需用移液器将细胞悬液吹吸均匀。(3)尽量快速完成检测,仔细操作,动作轻柔,离心速度与时间不宜过快和过长,避免对细胞造成损害。(4)注意操作间的无菌环境和细菌的无菌操作<sup>[10]</sup>。

流式细胞术已经广泛应用于动物、植物、微生物及细胞生物学领域<sup>[11-14]</sup>,相信这一高效细胞分选技术在今后会有更广泛的应用。

参 考 文 献

[1] 谢志雄,沈萍. 细菌遗传转化与水平基因转移[J]. 中南民族大学学报(自然科学版),2003,22(4):1-5.  
[2] 张瑞福,蒋建东,代先祝,等. 环境中污染物降解基因的水平转移(HGT)及其在生物修复中的作用[J]. 遗传,2005,27(5):845-851.  
[3] 刘江江,陈吕军,温东辉,等. 水平基因转移应用于污染治理的研

究进展[J]. 北京大学学报(自然科学版),2006,42(4):555-560.  
[4] 李璐,刘向宇,李德山. 应用流式细胞仪分选中性粒细胞的研究[J]. 东北农业大学学报,2009,40(4):52-55.  
[5] 尹德超,李羚,张明亮,等. 流式细胞仪分选大鼠胰岛  $\beta$  细胞方法的建立及应用[J]. 诊断学理论与实践,2012,11(3):263-268.  
[6] 张艺. 流式细胞仪构成与工作原理[J]. 医疗设备信息,2005,20(8):25-26.  
[7] 李斐,胡勇,王帆,等. 利用流式细胞仪分选拟南芥根尖发育早期非根毛细胞[J]. 植物学报,2010,45(4):460-465.  
[8] DAUGHERTY P S, IVERSON B L. Flow cytometric screening of cell-based libraries[J]. Journal of Immunological Methods,2000,243(1/2):211-227.  
[9] GROSS H J, VERWER B. Detection of rare cells at a frequency of one per million by flow cytometry[J]. Cytometry,1993,14(5):519-526.  
[10] 王萍,李润今,高学文,等. 经流式细胞仪分选神经细胞技术方法的建立[J]. 内蒙古医学杂志,2008,40(12):1416-1418.  
[11] 刘玉芝,李文玉,李成叶,等. 多种含硒化合物对犬乳腺癌细胞 CTM1211 的抑制作用及其机制[J]. 华中农业大学学报,2015,34(2):78-85.  
[12] LYNCH S A, GALLIVAN J P. A flow cytometry-based screen for synthetic riboswitches[J]. Nucleic Acids Research,2009,37(1):184-192.  
[13] 刘淑清,李平俊,鑫婷,等. 牛分枝杆菌重组蛋白 TB10.4 对 RAW264.7 细胞 TLR2 表达和分布的影响[J]. 华中农业大学学报,2015,34(1):83-90.  
[14] 吕婷,沈霏,邵小虎,等. 利用细胞壁锚定蛋白 Mba 构建新型苏云金芽胞杆菌表面展示系统[J]. 华中农业大学学报,2014,33(1):7-11.

Sorting positive transformants from natural transformation  
in soil with flow cytometer

WANG Yuping HUANG Qiaoyun CHEN Wenli

State Key Laboratory of Agricultural Microbiology, Huazhong Agricultural University,  
Wuhan 430070, China

**Abstract** One plasmid DNA with *egfp* and Kan<sup>r</sup> was introduced into the natural soil. The positive transformants were isolated directly from the bacterial suspension with flow cytometer and sorted with green fluorescence and kanamycin resistance. The frequency of natural transformation was less than  $10^{-7}$  in soil. After the enrich cultivation, 82 cells out of 39 736 426 were sorted. Positive transformants were finally obtained. The occurrence of horizontal gene transfer through natural transformation in soil was confirmed. Our studies break the lowest proportion limit of sorting with flow cytometry as well.

**Keywords** horizontal gene transfer; natural transformation; positive transformants; flow cytometry; sorting

(责任编辑:张志钰)