深圳先进院工程化空间隔离实现多物种菌群的构建

作者：writer 来源：中国科学院

本文原地址：https://www.iikx.com/news/progress/19128.html

本文仅供学习交流之用，版权归原作者所有，请勿用于商业用途！

7
月
5日
，中国科学院深圳先进技术研究院戴卓君课题组的最新研究成果发表在《自然-通讯》（*Nature Communications*
）上。研究团队在人工合成微生物群落领域，针对跨物种菌群因为竞争关系难以稳定共存的问题，提出了人工空间隔离的策略及方法，灵活、精确地构建了稳定的跨物种微生物群落，并可控组装了多种合成菌群，实现了生物合成34酶体系、针对污染物的生物降解、跨物种菌群间的分工与通讯以及光合菌群的构建。

合成微生物群落具有个体种群所不具备的特征和功能，在合成生物学研究领域中备受关注。例如，菌群成员可以通过信号分子交换、检测并相互响应等方式进行单向、双向甚至多向交流；菌群成员可以通过分工执行不同的任务，从而使整个菌群可以实现单一菌株无法完成的复杂功能；群落成员之间的相互协调，保证了群落结构和功能的稳定。自然界中，微生物群落在多个方面发挥重要作用。例如，土壤中的微生物群落可以参与碳循环，并在固氮和分解有机物等环节发挥重要作用。肠道微生物群落在代谢营养物质和防止病原体入侵方面发挥关键作用。因此，具备合成微生物群落的能力并可以精准调控其组分可造福于生物制造、生物医学和生物修复等多个领域。然而，在实验室条件下，构建跨物种微生物群落比培养单一菌株困难，这主要由于亚群之间营养物质的消耗和生产速度不匹配（分裂速度相差巨大）。例如，实验室常见的大肠杆菌（20分钟分裂一代）及酿酒酵母（90-120分钟分裂一代），单纯的混合共培养会使生长快速的物种迅速消耗掉营养，成为群落中的优势者，从而淘汰掉生长较慢的劣势物种。由此，建立一种普适性方法实现跨物种微生物群落的稳定构建及精准调控成为挑战。

天然微生物群落通过互惠共生等多种方式维持其群落结构稳定性。目前，多数合成微生物群落均使用相互作用设计（pairwise interactions）来调控群落关系。随着菌群种群数量增加，成对相互作用的数量和组合迅速增长并出现更高阶的相互作用，使构建、控制和预测菌群的（动态）行为变得困难。自然界中，微生物实现群落平衡的一种常用策略是空间分隔，即不同物种在空间上进行有序排布，可以行使分工与交流等群落功能，却不互相干扰。例如，土壤中不同的微生物以几百微米的距离形成各自的微菌落，这种空间分隔被认为是维持稳定的微生物生态系统的重要因素。科研团队开发了一种人工的空间分隔方法来构建由单一或多物种组成的合成微生物群落（图1），通过交联的凝胶网络构建尺寸为~400微米的微球并包裹微生物（Microbial swarmbot，MSB）。微球的三维网状交联结构允许小分子（营养物质、信号分子和代谢物）及生物大分子（蛋白质）的自由扩散，但会限制微球内的微生物的运动。因此，每个MSB代表一个可以与其他MSB交互的亚群。通过将包含不同亚群的MSB进行组合，科研人员进一步构建了微生物群落（Microbial

swarmbot consortia，MSBC）。由于MSB具有相对独立的生长空间和明确的承载上限。所以，即使菌群中种群的分裂时间不匹配也可以平衡增长。

研究团队首先验证了MSB环境中不同的微生物可以正常生长、代谢并行使特定的生物学功能（表达目标蛋白等）。例如，团队分别构建了大肠杆菌，酿酒酵母及毕赤酵母的MSB，并验证了其可以在MSB环境下生长并表达目的蛋白或小分子（大麻萜酚酸）。之后进一步构建了含有34 MSB的同物种MSBC（大肠杆菌），并实现了体外蛋白合成机器PURE(protein synthesis using recombinant elements)的一步组装（图2）。

研究人员进一步利用MSBC方法构建精准调控的跨物种群落。大肠杆菌和酿酒酵母是实验室研究和工业应用中使用广泛的两种微生物。共培养大肠杆菌和酿酒酵母可以潜在利用这两个宿主的优点，如大肠杆菌可以快速、大量合成蛋白质；酿酒酵母可以对复杂真核酶实现可溶性表达。然而，大肠杆菌（约20分钟）和酿酒酵母（约90-120分钟）的传代时间差异使大肠杆菌更有效地消耗营养并成为优势者。研究人员将表达红色荧光蛋白的大肠杆菌和表达绿色荧光蛋白的酿酒酵母接种到培养基中进行混合共培养，然后通过流式细胞仪分析它们的组成。研究表明，无论大肠杆菌初始的接种比例如何，最终都会在菌群中占据主导（图3a）。相比之下，MSBC方法可以实现两个物种的稳定培养以及成分的精准调控。科研人员首先构建了大肠杆菌和酿酒酵母分的MSB，并通过调控两种MSB的接种比例组装了一系列MSBC。结果显示，这两个物种分别在自己的MSB内增殖，物种间有明确的空间界限，并且通过调整两个物种MSB的接种比例可以精确调节菌群的组成（图3b-c）。

研究人员设计了三种不同的MSB，其中包含大肠杆菌（蓝色荧光标记）、酿酒酵母（绿色荧光标记）或谷氨酸棒杆菌（红色荧光标记）。通过灵活组合形成不同的MSBC。结果表明，MSBC平台具备灵活性及可控性，通过简单切换不同的MSB，MSBC可以即插即用，创建一系列兼具灵活性和精度的组合(图3d-f)。科研人员使用合成生物学工具对MSBC进行编程，实现了合成生物群落的分工与通讯，并构建了可实现光合自养的微生物群落：（1）在农业生产中，过度使用兽药和杀虫剂导致农业废水存在大量抗生素和有机磷废物。科研人员构建了可自裂解释放β-内酰胺酶（Bla）的大肠杆菌以及分泌表达重组人对氧磷酶（rh-PON1）的毕赤酵母；其中，Bla可以通过破坏β-内酰胺环来降解β-内酰胺类抗生素;rh-PON1可以通过水解作用降解有机磷。使用壳聚糖水凝胶分别对它们进行封装形成MSB，共培养组合的MSBC可以获得包含Bla和rh-PON1在内的产物，使用MSBC的产物进行降解实验，结果表明，该蛋白混合物可以成功降解氨苄青霉素和对氧磷。（2）科研人员设计了一对发送器和接收器MSB。发送器MSB内的大肠杆菌可诱导表达3-oxo-C12-HSL(3OC12)信号分子，3OC12可以扩散穿过细菌膜和聚合物胶囊，然后被接收器MSB内的酿酒酵母的相应变构转录因子(VP16-LasR)感知，触发YFP的表达。同样地，MSBC可以严格调控发送器和接收器细胞的组成。因为信号分子3OC12的浓度由发送器的占比所决定，较易调节MSB内部的通信强度，通过调节发送器和接收器MSB的接种比例，可以逐渐激活接收器的YFP表达强度（图4）。MSBC平台还可以在通信过程中调控信号范围。研究制造了具有两个腔室的微型设备，通过不同长度的通道连接，分别接种发送器MSB和接收器MSB到两个腔室中。结果表明，无论距离如何（0到30毫米），接收器MSB的细胞均被发送器激活。（3）工程合成光养群落对生物能源具有前景。科研人员使用蓝藻和大肠杆菌设计构建了光合自养的MSBC，光合自养的微生物蓝藻可以利用CO_2
合成蔗糖，通过遗传改造可以使其在渗透压力下将蔗糖释放到细胞外；同样使用合成生物学工具改造的大肠杆菌可以将环境中的蔗糖运输到细胞内进行新陈代谢，促进细胞生长（图5）。通过构建蓝细菌及大肠杆菌的MSB，科研人员组装了光能自养的MSBC，在没有有机碳源的基础培养基中，成功维持了异养 MSB（大肠杆菌）的生长。

该研究中，科研人员开发了利用空间分隔的策略构建微生物群落的方法。MSBC平台可以通过调整不同MSB的种类、数量和培养体积来灵活、精确调控群落结构并可轻松扩大规模。MSBC平台可以根据设计使用包含不同菌株或物种的各种MSB构建微生物群落，宿主微生物和封装材料可以单独设计或优化，然后集成。上述属性使MSBC平台具有高度的通用性和灵活性，可设计定制功能复杂多样的合成微生物群落。

研究工作得到国家自然科学基金面上项目、国家重点研发计划、深圳合成生物学创新研究院、深圳市科技创新委员会、广东省自然科学基金杰出青年等的支持。

论文链接

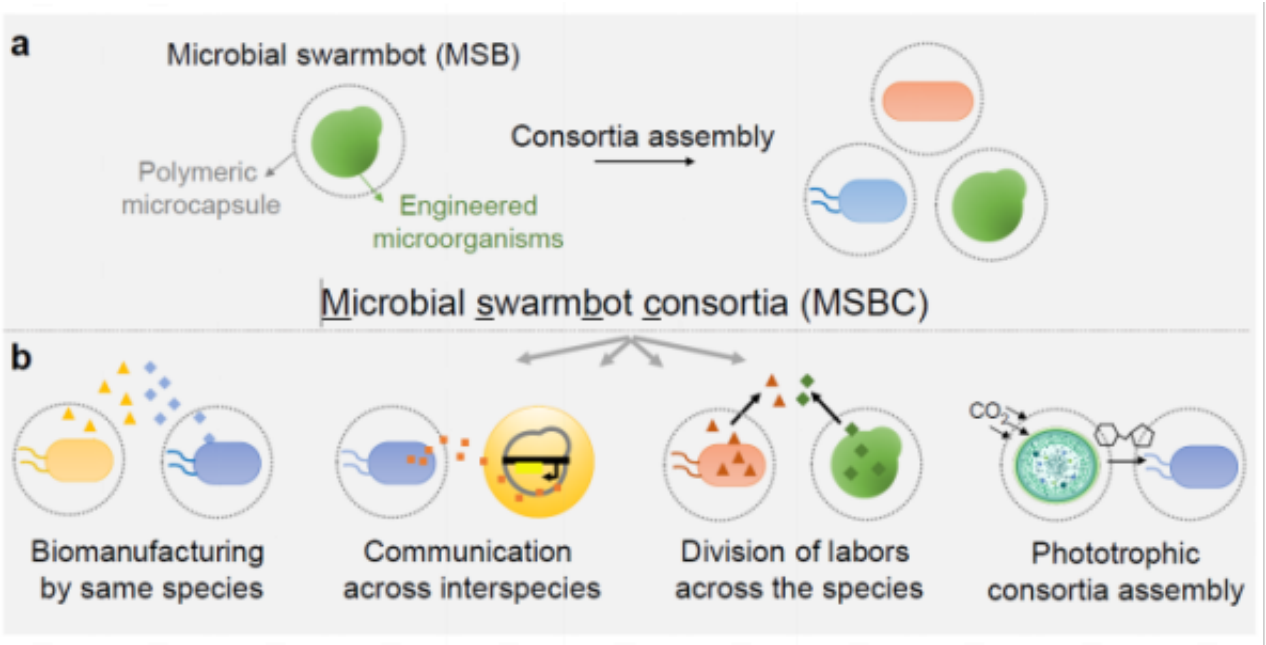


图1.合成微生物菌群MSBC示意图。a.微生物通过聚合物水凝胶封装形成的微生物微球（MSB），将包含不同微生物亚群的MSB共培养以形成合成微生物菌群（MSBC）。b.MSBC平台可实现多种应用，例如，MSBC（单一物种）可以共同制造多酶系统；MSBC的不同微生物可以进行分工和交流；光合自养MSBC可以通过光养型微生物将二氧化碳转化为碳源，以维持异养型微生物的生长。

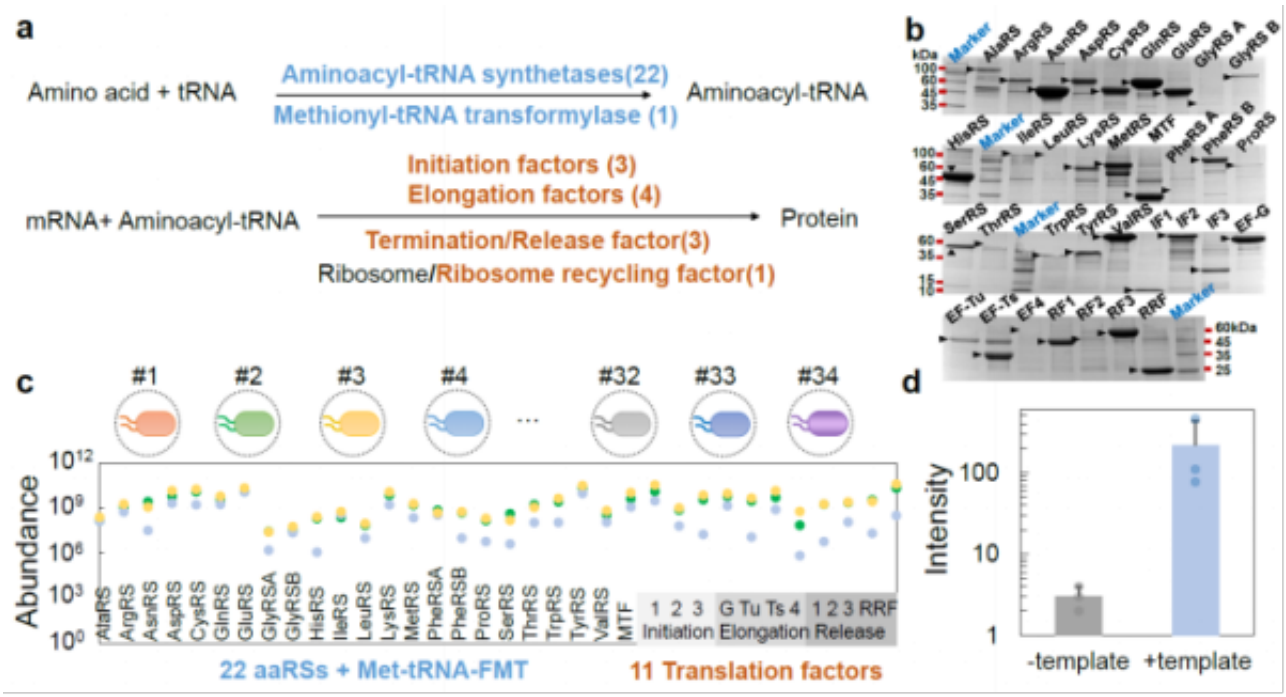


图2.MSBC生产PURE重组蛋白质元件。a.大肠杆菌中蛋白质合成的核心机制需要34种酶。b.34种MSB单独培养产生了相应的34种酶。c.34种MSB组成的MSBC培养产物包含相应的34种酶。d.使用MSBC产物构建的PURE反应机器成功表达了RFP。

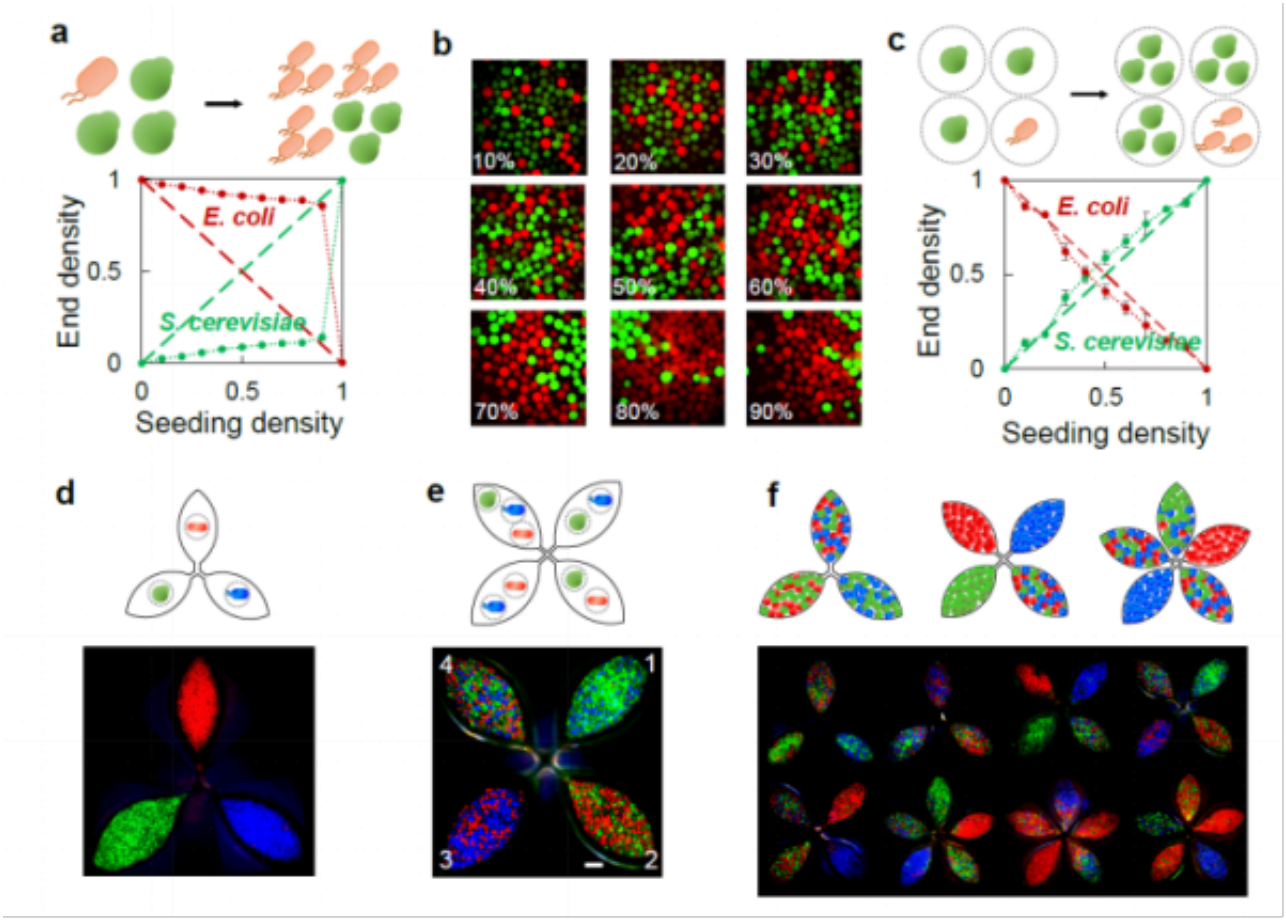


图3.MSBC平台以灵活和精确的方式构建了多种微生物菌群。a.普通培养方式下，大肠杆菌和酿酒酵母的合成群落无法控制两者间的比例。b.大肠杆菌MSB和酿酒酵母MSB以不同比例混合接种到培养基，荧光显微镜拍摄培养后的MSBC。c.MSBC方法可以精确控制大肠杆菌及酿酒酵母间的比例。d-f.MSBC方法构建了一系列精确调控比例的合成微生物群落。

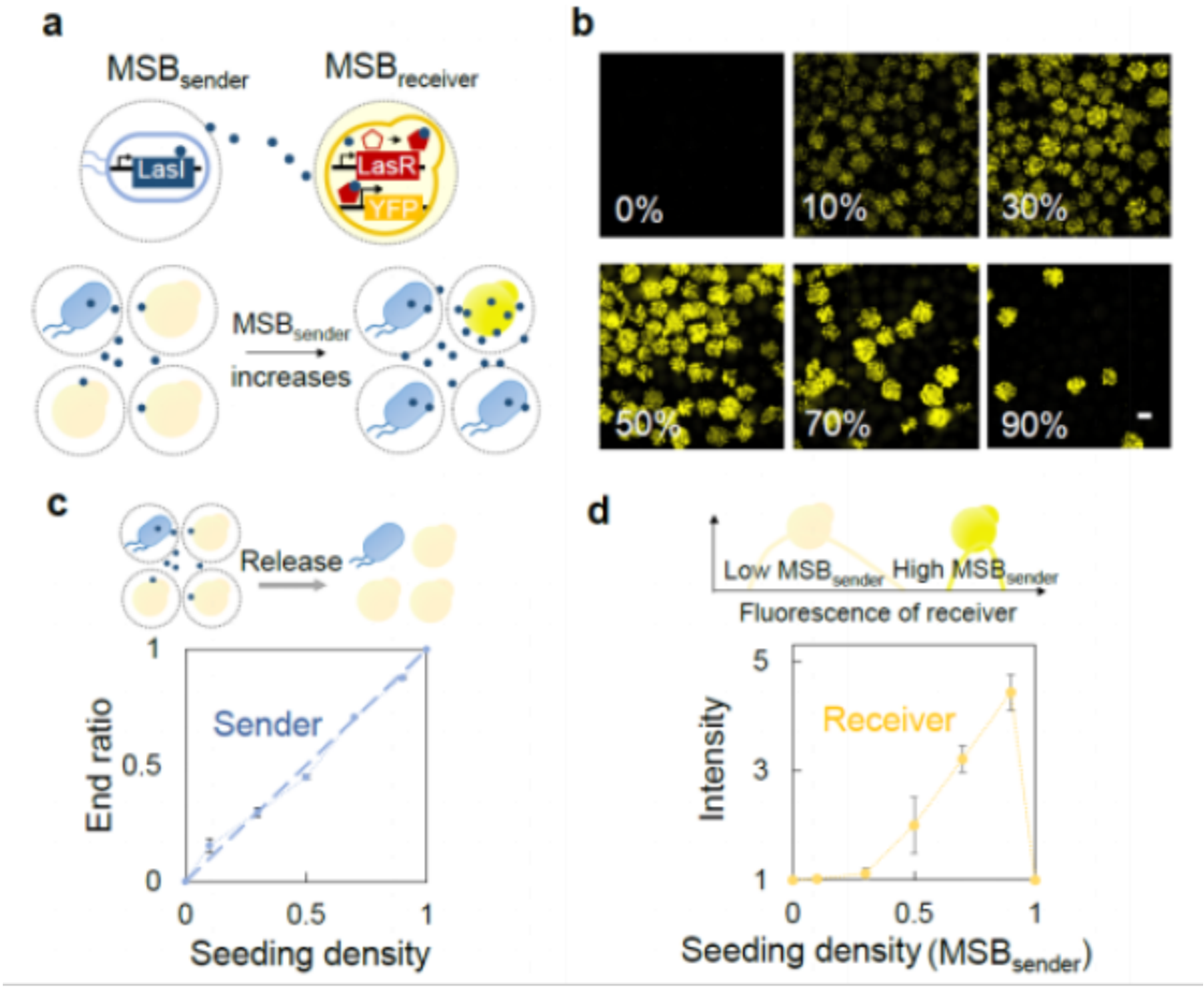


图4.MSBC平台实现了跨物种的通讯。a.大肠杆菌和酿酒酵母MSBC通讯示意图。b.发送器MSB的接种比例增加会逐渐激活接收器MSB的黄色荧光蛋白的表达。c.发送器MSB和接收器MSB以不同比例（MSB总数一致）混合接种到培养基，定量分析培养后的发送器细胞占比。d.发送器MSB和接收器MSB以不同比例（MSB总数一致）混合接种到培养基，定量分析接收器细胞的荧光信号强度。

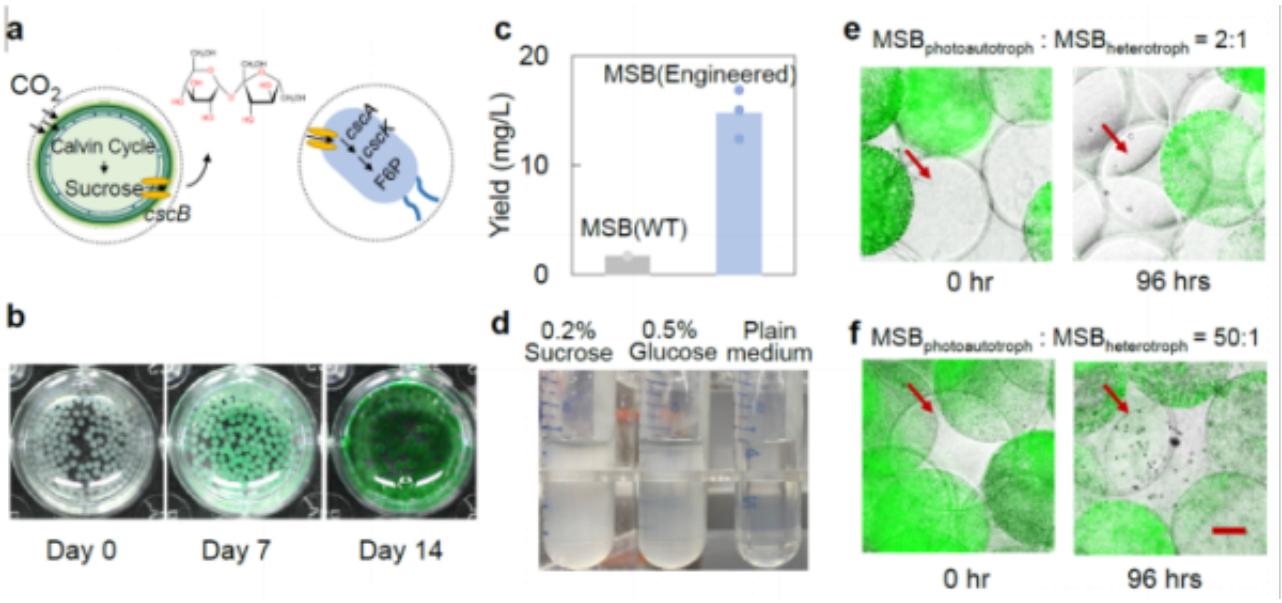


图5.MSBC平台构建光合自养菌群。a.蓝藻和大肠杆菌组成的光合自养菌群示意图。b.海藻酸盐水凝胶封装的蓝藻细胞可以在MSB中生长。c.蓝藻MSB在渗透压力下产生并释放蔗糖到胞外。d.工程化大肠杆菌可以利用蔗糖作为碳源生长。e.蓝藻MSB低接种密度条件下，大肠杆菌MSB生长不明显。f.蓝藻MSB高接种密度条件下，大肠杆菌MSB中形成多个菌落。

研究团队单位：深圳先进技术研究院

更多 科学进展 请访问 https://www.iikx.com/news/progress/

本文版权归原作者所有，请勿用于商业用途，爱科学iikx.com转发