**培养组学方法优化**

**Optimization of Culturomics Methods**

常宇骁1，侯凤仪1, #，毕玉晶1, \*，杨瑞馥1, \*

1军事科学院军事医学研究院，微生物流行病研究所，北京

\*通讯作者邮箱：[byj7801@sina.com](mailto:byj7801@sina.com)；[13801034560@163.com](mailto:13801034560@163.com)

#共同第一作者

**摘要：**培养组学是一种采用多种培养条件，利用MALDI-TOF质谱和16S rRNA测序鉴定细菌种属的培养方法。人类肠道菌群中仍有大部分细菌难以培养，目前培养组学的发展给这些难以培养的细菌带来了新的希望。本实验方法通过延长预培养时间，选择7个固定时间点，按颜色、形态、大小挑取单克隆的方法来分离预培养混合菌液，并通过补充培养基、添加抑制剂两个额外的培养条件来增加分菌数量。通过本实验方法可以有效的增加分离培养的菌种数目，并在保证尽可能不减少分出菌种数量的前提下降低工作量，同时增加了发现细菌新种/属的可能性。

**关键词：**肠道菌群，培养组学，方法优化

**材料与试剂**

1. 50 ml无菌离心管 (Corning，catalog number: 430828)
2. 血培养瓶 (郑州安图公司, catalog number: BC120)
3. 脱脂绵羊血 (北京宝特医疗有限公司, catalog number: H0011)
4. 瘤胃液 (ELITE-MEDIA, catalog number: A386-01)
5. 半胱氨酸 (Cysteine) (Sigma, catalog number: C7352-25g)
6. 刃天青 (Resazurin) (Sigma, catalog number: R7017-5g)
7. 血红素 (Haemin) (Sigma, catalog number: 51280-5g)
8. 生物素 (Biotin) (Sigma, catalog number: B4639-100mg)
9. 钴胺素 (Cobalamin) (Sigma, catalog number: V2876-250mg)
10. 对氨基苯甲酸 (p-aminobenzoic acid) (Sigma, catalog number: A9878-5g)
11. 叶酸 (Folic acid) (Sigma, catalog number: F7876-1g)
12. 吡哆胺 (Pyridoxmine) (Sigma, catalog number: P9158-1g)
13. 胰蛋白冻 (Casitone) (Sigma, catalog number: 6054)
14. 酵母提取物 (Yeas extract) (OXOID, catalog number: LP0021)
15. 碳酸氢钠 (NaHCO3) (沪试, catalog number: 144-55-8)
16. 磷酸氢二钾 (K2HPO4) (沪试, catalog number: 2139900)
17. 磷酸二氢钾 (KH2PO4) (沪试, catalog number: 7778-77-0)
18. 氯化钠 (NaCl) (西陇科学，CAS[7647-14-5])
19. 硫酸镁 (MgSO4·7H2O) (沪试, catalog number: 10034-99-8)
20. 氯化钙 (CaCl2) (西陇科学，CAS[10043-52-4])
21. 硫胺素 (Thiamine) (Sigma, catalog number: T4625)
22. 核黄素 (Riboflgvin) (Sigma, catalog number: R-4500)
23. 葡萄糖 (沪试, catalog number: 14431-43-7)
24. 琼脂糖 (欣经科, catalog number: 4002)
25. 裂解液和质谱基质 (郑州安图公司)
26. DNeasy blood&tissue (QIAGEN, catalog number: kit 69506)
27. 抑制剂CHIR-090 (北京百奥莱德公司)
28. YCFA培养基 (见溶液配方)

**仪器设备**

1. 粪便收集器 (Norgen Biotek，model: NGB-27650)
2. 100 ml锥形瓶 (Hario，model: 100ml)
3. 灭菌锅 (Yamato，model: SQ510C)
4. MALDI-TOF质谱仪 (郑州安图公司，model: Autof MS1000)
5. 恒温震荡培养箱 (宿州培英实验设备有限公司model: HZQ-F160)
6. 厌氧培养箱 (英国Ruskinn公司，model: INVIVO2 400)
7. 涡旋仪 (其林贝尔仪器制造有限公司，model: UNAIR)
8. 恒温培养箱 (天津市泰斯特仪器有限公司，model: DH3600AB)
9. 全温震荡培养箱 (宿州培英实验设备有限公司，model: HZQ-F160)

**实验步骤**

1. 取样
   1. 粪便样本：提前将粪便收集器高压灭菌，同时准备50 ml无菌离心管，加入20 ml无菌PBS。用粪便收集器，在洁净环境下取新鲜样本，随后将重量大概为1 g的样本放入事先准备好的装有PBS的离心管里，进行重悬混匀，然后静置5 min。上述操作按照需氧或厌氧条件，分别在生物安全柜或厌氧培养箱中操作完成。
   2. 组织样本：按照实验目的，严格按照无菌要求取合适大小的组织，随后放入无菌研磨棒中，加入2 ml无菌PBS进行充分研磨，然后静置5 min。上述操作按照需氧或厌氧条件，分别在生物安全柜或厌氧培养箱中操作完成。
2. 准备预培养并延长预培养时间
   1. 准备试剂和器材：按照实验需求，将若干数量的100 ml锥形瓶瓶口用牛皮纸封口，并将锥形瓶装入高压带中并密封，进行121 °C，20 min高压灭菌。
   2. 准备血培养瓶：血培养瓶分为两种条件，分别为厌氧和需氧条件，因需延长培养时间，而商品化的血培养瓶为密封状态，因此需氧条件下的血培养瓶用100 ml锥形瓶代替。需氧条件在生物安全柜中操作，用注射器抽取40 ml需氧血培养瓶中培养液于无菌100 ml锥形瓶中，然后分别依次加入5 ml无菌脱纤维绵羊血和5 ml无菌瘤胃液 (Lagier*等*，2015)，最后用牛皮纸封口 (并非密封，可保持需氧状态)。厌氧条件在厌氧培养箱中操作，将厌氧血培养瓶中分别依次加入5 ml无菌脱纤维绵羊血和5 ml无菌瘤胃液。
   3. 加样：取0.5 ml静置后的样本上清，加入各个条件的血培养瓶中。
   4. 定期取样：血培养瓶预培养共27天，培养条件为需氧或厌氧，37 °C。分别在0、3、6、9、15、21、27天7个时间点抽取各个条件下的血培养瓶中的混合菌液2.5 ml，其中2 ml进行保藏，冻存于-80 °C。剩余0.5 ml混合菌液进行后续分纯。
   5. 补充培养基条件：其中补充培养基培养即在抽取混合菌液2.5 ml后补充加入等体积的原始培养基 (血培养瓶营养液+羊血+瘤胃液)，以保证养分始终保持充足状态，其他培养条件与空白组相同 (Chang*等*，2019)。
   6. 添加抑制剂培养：抑制剂条件使用的是抑制剂CHIR-090 (北京百奥莱德公司)，其作用是抑制以大肠杆菌为主的部分革兰氏阴性菌。将20mg的抑制剂CHIR-090溶解于1 ml过滤除菌后的DMSO (现配现用)，彻底溶解后，加入到配制好的预培养的血培养瓶中 (抑制剂浓度=400 μg/ml)，进行延长预培养时间培养，定期取样及培养条件同前，后续不再添加抑制剂 (Hou*等*，2019)。
3. 混合菌液稀释涂布
   1. 配制培养基：根据实验目的配制不同营养成分的固体和液体培养基 (例如适合肠道菌群生长的YCFA培养基 (Duncan*等*，2002；Browne*等*，2016)。其中厌氧条件下培养的培养基需在厌氧箱中提前放置2天。
   2. 混合菌液稀释涂布：剩余0.5 ml预培养混合菌液中抽取100 μl依次倍比稀释至10-10倍，然后每个稀释梯度抽取100 μl添加到固体培养基上，用涂布棒均匀涂开。其中需氧条件在生物安全柜中操作，操作结束后放置37 °C恒温培养箱中培养1天。厌氧条件在厌氧箱中操作，操作结束后同样在厌氧箱中37 °C条件下培养3天。
4. 挑取单克隆及液体扩增
   1. 挑取单克隆：待各个条件的固体平板培养好后，选取单克隆数目在100~500的固体平板进行挑取单克隆。单克隆的挑取方式为：根据单克隆的大小、颜色、形态，每种单克隆挑取2~3个。
   2. 单克隆液体扩增：提前将液体培养基加入到高压无菌的试管中，每个试管中加入5 ml培养基。将挑取的单克隆添加到试管中，稍摇匀后放入对应的培养条件下进行培养。其中需氧条件在生物安全柜中操作，操作结束后放置37 °C恒温培养箱中培养1天。厌氧条件在厌氧箱中操作，操作结束后同样在厌氧箱中37 °C条件下培养3天。
5. 细菌分纯及保藏
   1. 细菌平板划线：待细菌液体扩增培养好之后，将每株细菌在对应的固体培养基上三区划线，然后将固体培养基放入厌氧箱或37 °C恒温培养箱进行培养，其中需氧培养1天，厌氧3天。
   2. 细菌保藏：将剩余单克隆液体扩增菌液按照20%甘油+80%菌液的比例进行甘油保菌，每株细菌保藏2支，做好标记，最后冻存于-80 °C。
6. 细菌鉴定
   1. MALDI-TOF质谱鉴定：已分纯细菌的三区划线培养好之后，用牙签挑取少量单克隆轻轻涂在MALDI-TOF质谱板对应的检测位置，然后滴加裂解液和质谱基质，待基质晾干后上机检测。检测结果≥9为可信，<9为不可信 (注：不同型号质谱仪对于结果衡量标准不同)，若不可信则重新复苏对应细菌进行16S rRNA基因测序鉴定。
   2. 16S rRNA基因测序鉴定：对MALDI-TOF质谱鉴定不可信的细菌进行重新复苏，然后提取DNA进行16S rRNA基因测序，根据Blast比对结果鉴定细菌种类。
   3. 新菌鉴定：如果Blast比对<98.65%，则可能是一个新种 (Lagier*等*，2018)，则需从进化、生理、生化、脂肪酸等方面进行细菌鉴定。

**注意事项**

1. 取样时虽然有些样本（例如粪便样本）难免会违反无菌原则，但是操作时也应尽量保持干净的环境，选择洁净的取样环境，并对房间进行消毒处理，利用专业无菌的粪便收集器进行收集样本，并用无菌棒进行样本采集。
2. 厌氧血培养瓶中加羊血和瘤胃液过程中要时刻注意不要将外部气体带入瓶内。
3. 部分单克隆相邻较近，挑取过程中应注意不要污染。
4. 抑制剂CHIR-090要现配现用，以免失效。
5. 涂MALDI-TOF质谱鉴定的孔板时，避免细菌涂抹太厚或不均匀。

**溶液配方**

YCFA培养基

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  | **名称** | **英文/化学名** | **每100 ml含量** |
| 试剂1 | 血红素 | haemin | 1 mg |
| 半胱氨酸 | cycteine | 0.1 g |
| 胰蛋白胨 | Tryptone | 1 g |
| 酵母提取物 | yeast extract | 0.25 g |
| 碳酸氢钠 | NaHCO2 | 0.40 g |
| 磷酸氢二钾 | K2HPO4 | 0.045 g |
| 七水合硫酸镁 | MgSO4·7H2O | 0.009 g |
| 氯化钙 | CaCl2 | 0.009 g |
| 磷酸二氢钾 | KH2PO4 | 0.045 g |
| 氯化钠 | NaCl | 0.09 g |
| 琼脂粉 (固体培养基) | Agar power | 1.5 g |
| 试剂2 | 刃天青 | resazurin | 0.1 mg |
| 生物素 | biotin | 1 μg |
| 钴胺素 | cobalamin | 1 μg |
| 对氨基苯甲酸 | p-aminobenzoic acid | 3 μg |
| 叶酸 | folic acid | 5 μg |
| 吡哆醛 | pyridoxmine | 15 μg |
| 试剂3 | 硫胺素 | thiamine | 0.05 μg |
| 核黄素 | riboflavin | 0.05 μg |
| 葡萄糖 | glucose | 25 mM |

*注：*

* + 1. *试剂1中的试剂为粉末，在配制过程中按照配方比例直接添加到容器中，然后加入800 ml的去离子水。*
    2. *试剂2中的试剂需分别配制成溶液，具体配制方法为将一定重量的固体粉末溶解于一定体积的去离子水中，然后在高压灭菌前按照自己配制的溶液浓度和配方比例添加一定体积的配制溶液，配制好的溶液放于-20 °C保存。试剂1和试剂2中的试剂都添加完毕后进行进行121 °C，20 min高压灭菌。*
    3. *试剂3中的试剂不耐高温，因此需高压过后添加。具体配制方法同试剂2，同样配制成溶液，按照配方比例添加，但是添加前注意需用过滤器进行过滤灭菌。配制好的溶液放于-20 °C保存。*

**致谢**

本项研究得到了国家自然科学基金重点项目 (No. 81790632)、国家自然科学基金 (No. 31970863)和广州创新领军团队计划 (No. 201809010014)项目支持。

**参考文献**

1. Browne, H., Forster, S., Anonye, B., Kumar, N., Neville, B., Stares, M., Goulding, D. and Lawley, T. (2016). [Culturing of 'unculturable' human microbiota reveals novel taxa and extensive sporulation.](https://www.nature.com/articles/nature17645) *Nature* 533: 543-546.
2. Chang, Y., Hou, F., Pan, Z., Huang, Z., Han, N., Bin, L., Deng, H., Li, Z., Ding, L., Gao, H., Zhi, F., Yang, R. and Bi, Y. (2019). [Optimization of Culturomics Strategy in Human Fecal Samples.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31921067) *Front Microbiol* 10: 2891.
3. Duncan, S. H., Hold, G. L., Harmsen, H. J. M., Stewart, C. S. and Flint, H. J. (2002). [Growth requirements and fermentation products of Fusobacterium prausnitzii, and a proposal to reclassify it as Faecalibacterium prausnitzii gen. nov., comb. nov.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12508881) *Int J Syst Evol Microbiol* 52(Pt 6): 2141-2146.
4. Hou, F., Chang, Y., Huang, Z., Han, N., Bin, L., Deng, H., Li, Z., Pan, Z., Ding, L., Gao, H., Yang, R., Zhi, F. and Bi, Y. (2019). [Application of LpxC enzyme inhibitor to inhibit some fast-growing bacteria in human gut bacterial culturomics.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31888576) *BMC Microbiol* 19(1): 308.
5. Lagier, J. C., Dubourg, G., Million, M., Cadoret, F., Bilen, M., Fenollar, F., Levasseur, A., Rolain, J. M., Fournier, P. E. and Raoult, D. (2018). [Culturing the human microbiota and culturomics.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29937540) *Nat Rev Microbiol* 16: 540-550.
6. Lagier, J. C., Hugon, P., Khelaifia, S., Fournier, P. E., La Scola, B. and Raoult, D. (2015). [The rebirth of culture in microbiology through the example of culturomics to study human gut microbiota.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25567229) *Clin Microbiol Rev* 28(1): 237-264.