单细菌捕获技术应用于细菌尺寸调控规律

马智鑫^{1,2†}, 温慧^{1†}, 沈雅欣¹, 曹豪杰¹, 邓宇芳¹, 梁帆¹, 于跃¹, 刘陈立^{1,2*}, 黄术强^{1,2*}

1. 中国科学院深圳先进技术研究院, 深圳合成生物学创新研究院, 中国科学院定量工程生物学重点实验室, 广东省合成基因组学重点实验室, 深圳 518055;

2. 中国科学院大学计算机科学与技术学院, 北京 100049

† 同等贡献

* 联系人, E-mail: cl.liu@siat.ac.cn; shuqiang.huang@siat.ac.cn

2020-04-23 收稿, 2020-06-19 修回, 2020-06-22 接受, 2020-06-23 网络版发表

国家自然科学基金(31971350, 31770111, 31800083)、深圳市科技创新委员会(JCYJ20180302145817753, KQTD2016112915000294, KQTD2015033117210153)和中国博士后科学基金(2017M622832, 2018M631002)资助

摘要 在规定的培养条件下, 细菌的细胞尺寸大小能稳定在一定的范围内, 即便遭受环境波动或自身内部噪声影响, 细菌细胞仍能够维持自身尺寸稳态. 这种尺寸调控遵循怎样的规律, 以及规律背后的生物学意义如何, 一直以来都吸引着人们关注, 相关研究也在进行. 近年来, 由于群体水平的研究并不能很好地解释一些现象, 在单细胞水平探究细菌生长过程所遵循的各种规律成为一种新的趋势. 得益于多种单细菌捕获技术的发展, 研究者们能够更加方便、合理地在单细胞水平对细菌开展相关研究. 对细菌的尺寸调控研究, 单细胞数据所呈现的结果与群体研究所得到的信息存在出入, 前者能更精准、全面地反映被群体所覆盖的信息, 使我们从群体培养所得到的“筛选器(sizer)”与“计时器(timer)”模型转向“加法器(adder)”与“噪声线性谱(noisy linear map)”模型. 本文将结合单细菌捕获技术的介绍, 简述细菌的各种尺寸调控机制理论与模型, 希望有助于研究者快速了解本领域目前的研究进展与相关的基础理论体系.

关键词 单细菌捕获技术, 尺寸调控, 细菌生理学, 微流控

早在20世纪40年代, Monod^[1]就采用测量细菌液体培养物光密度的方式来获得其浊度, 进而对细菌的生长进行量化, 分析细菌的尺寸调控规律. 到目前为止, 研究人员已经发展出了很多关于细菌尺寸调控的理论(表1), 除了“筛选器(sizer)”、“计时器(timer)”等经典理论^[2,7], 近年来不断提出的新理论, 如“加法器(adder)”模型、噪声线性谱(noisy linear map)等^[8,10], 都对细菌的表征技术提出了更高的要求, 体现在如何实现细菌尺寸变化以及基因表达水平的高时空分辨率分析, 以及如何从统计学的角度对调控规律提出更为可靠的科学依据. 为此, 在前期工作的基础上^[10], 我们构建了一

套微流控全自动光学系统, 实现细菌样品的自动化处理及分析, 包括单细胞捕获装置、流体控制系统、温度控制系统、自动化聚焦系统以及高通量图像处理系统, 为了解复杂环境下的细菌尺寸调控规律提供了进一步的解决方案. 结合该光学系统, 我们希望在接下来的研究中, 将细菌培养在不同的环境压力条件下, 如抗生素压力^[13]、病毒入侵^[14]以及氧气缺乏^[15]等, 分析细菌尺寸调控机制的变化.

1 群体水平关于细菌细胞尺寸调控的理论

早期, 研究细胞尺寸的方法是基于单个细胞的光

引用格式: 马智鑫, 温慧, 沈雅欣, 等. 单细菌捕获技术应用于细菌尺寸调控规律. 科学通报, 2021, 66: 384–392

Ma Z X, Wen H, Shen Y X, et al. Applying single-cell capture technologies to studies of bacterial cell-size regulation (in Chinese). Chin Sci Bull, 2021, 66: 384–392, doi: [10.1360/TB-2020-0453](https://doi.org/10.1360/TB-2020-0453)

表1 关于细菌细胞尺寸稳态调控的相关理论

Table 1 Related theories about bacterial cell-size regulation

理论	主要内容	研究对象	研究水平	文献
筛选器	细胞达到尺寸阈值后分裂	<i>Schizosaccharomyces pombe</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Salmonella typhimurium</i>	群体, 单细胞	[2,3]
计时器	初生细胞经历一定时间阈值后分裂	<i>Escherichia coli</i> , <i>Chlamydomonas</i>	群体, 单细胞	[4-6]
筛选器+计时器	细胞达到特定尺寸后再经历一段恒定的时间后分裂	<i>Escherichia coli</i>	单细胞	[7]
加法器	初生细胞增加一个固定的尺寸后分裂	<i>Caulobacter crescentus</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Bacillus subtilis</i>	单细胞	[8,9]
噪声线性谱	细胞尺寸围绕特定尺寸进行周期性振荡	<i>Escherichia coli</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	单细胞	[10-12]

吸收量正比于细胞尺寸的假设, 通过测量细菌悬液的吸光度间接得出细胞生长规律. 利用这种方法, Schaechter等人^[3]于1958年提出了被称为“生长法则(growth law)”的细菌生理规律. 细菌“生长法则”告诉我们, 一个菌群中的细胞平均尺寸随着营养导致的生长速率的增长而呈指数增长. 在一个稳定的环境下, 处在同一时期的单个细胞尺寸会发生随机波动, 但群体细胞的平均尺寸基本恒定, 说明细胞能够对其尺寸波动产生反馈, 并通过调节保持尺寸的稳定. 研究者曾使用“筛选器”和“计时器”两种不同的模型对细菌细胞尺寸调控机制进行解释, 支持者认为细胞到了一定的空间(细胞尺寸)或者时间(生长时间)阈值后会在某种更深层的机制下触发细胞分裂^[2,3,5].

筛选器模型的核心内容是细胞在一定机制下能“感受”自身尺寸大小, 在其达到一个尺寸阈值后会启动自身的细胞分裂, 从而实现无论新生细胞的初始尺寸如何都能在达到相同尺寸时分裂, 保证了对新生细胞初始尺寸差异的补偿, 实现了细胞尺寸稳态的维持^[16]. 而这个尺寸阈值与其所处的营养条件相关, 由于营养条件对细胞的影响可通过生长速率的大小直接体现出来, 因此筛选器控制下的细胞分裂通过这种偶联进行环境响应.

筛选器模型最典型的例子是酵母, 包括裂殖酵母和芽殖酵母在内, 其尺寸调控规律都已经有了较为系统的研究, 已经深入到分子机制^[2,16]. 除此之外, 有研究指出, 处于较低生长速率下的大肠杆菌, 其尺寸也受筛选器模型所调控^[4].

如果说筛选器是以空间信息作为细胞尺寸调控的直接输入参数, 那么计时器则是以时间信息作为细胞尺寸调控的直接输入参数. 计时器模型的主要观点是

细胞尺寸调控与细胞“年龄”有关, 这个年龄即指细胞分裂后所经历的时间. 简而言之, 计时器模型认为, 细胞只有达到一定年龄才会启动分裂, 这种关系维系了细胞与环境的联系, 并且细胞的尺寸分布基本不受温度影响^[4].

之后, 根据已有的数据, 研究者提出了筛选器和计时器结合的模型: 当在细胞生长到特定的尺寸后, 另一个系统计时器开始发挥作用, 使细胞经历一个恒定的时间延迟再发生分裂. 这个理论不仅能很好地与细菌“生长法则”吻合, 而且还能与之后的细胞生长、细胞周期和尺寸调控的实验及模型结果相匹配. 为了更精准地描述细菌对细胞尺寸的调控, 通过光学显微镜辅以电子显微镜的直接观察, 研究人员统计了*E. coli*细胞的平均长度, 进一步肯定了“筛选器”和“计时器”相结合的模型, 即细菌细胞达到特定长度后, 再经过约20 min, 细胞开始分裂, 而这与细胞生长速率无关^[17].

虽然基于“筛选器+计时器”模型的细胞尺寸调控机制能够很好地解释基于群体分析方法的细胞尺寸稳态现象, 但是由于细胞存在异质性, 即个体间存在一定的差异, 包括初始大小、生长速率、基因表达水平等, 并且群体分析方法得到的数据是大量细胞尺寸的平均值, 平均值忽略了不同细胞之间的个体差异, 丢失了大量的细节信息, 最终可能导致最重要的因果关系被掩盖^[18]. 研究细菌尺寸调控机制的最直接实验证据来自对大量单细胞尺寸变化的监测和分析. 单细胞数据的获得需要满足一系列苛刻的实验条件, 其中包括为单细胞持续提供稳定生长环境的能力、长时间精确获取单个细胞尺寸信息的能力、同时跟踪大量单个细胞的尺寸变化的能力、快速分析处理海量单细胞尺寸数据的能力等, 这些是传统的生物学方法无法实现的. 由于

上述因素的限制,细菌尺寸调控机制的研究直到21世纪之前都没有实质性的突破。

2 单细菌捕获技术

随着对基因表达随机性(噪声)与细胞间异质性研究的深入^[19,20],研究者愈加认识到群体水平的研究在一些研究领域遇到了一定的瓶颈,对基因表达与调控^[21]、细胞分裂与细胞周期^[12,22]等许多细菌生理学方面的机理研究需要进一步深入到单细胞水平,因此人们对单细胞水平研究方法的需求也越来越高。研究者希望通过各种技术实现对单个细胞的信息捕获,并且在实验数据获取前后,确保这些细胞还处于正常的生长状态,力求将实验数据的获取操作对细胞生长的影响降到极低,即保证“观察但不触碰(look—but do not touch)”的原则。

目前,达到以上效果的实验技术分别为利用琼脂糖平板或利用微流控芯片的单细胞培养与观察系统,同时,两者均基于能够保证细菌培养外部环境同时实现延时拍摄的全自动光学系统(图1)。

2.1 基于琼脂糖平板的单细胞观察系统

基于琼脂糖平板的单细胞观察系统,顾名思义就是将细菌培养于含所需培养基的琼脂糖平板上实时观察(图1(a))。此系统是Elowitz实验室发展并完善的一种技术^[23],主要包括细菌的活化、琼脂糖平板准备、成像样品准备、延时拍摄设置、数据收集与分析等步骤。由于培养的细胞往往表达有荧光蛋白,因此在荧光显微镜进行一段时间(一般24 h以内)数据收集后,既可以通过将延时拍摄的照片导出为视频来直观定性地观察实验现象,也可以通过图像处理分析技术提取这些照

图1 (网络版彩色)基于延时拍摄光学系统的单细菌捕获技术^[28]。(a) 琼脂糖平板; (b) 微腔室结构的微流控芯片; (c) mother machine(左: 母细胞被限制在子通道的封闭顶端, 其他分裂而来的子细胞最终会被推挤至主通道, 并被培养基冲走; 右: 利用延时拍摄进行多点取样可以确保有足够的数据进行分析)

Figure 1 (Color online) Single cell capture technologies based on time-lapse optical system^[28]. (a) Agarose pads; (b) micro chamber in microfluidic chips; (c) mother machine (left: Mother cells are confined at the dead end of subchannels, daughter cells divided from them will be pushed to main channel; right: Time-lapse multipoint can provide enough data for analysis)

片所包含的实验信息,从而进行后续相关定量分析。

利用此系统,研究者可以在单细胞水平描述细胞的基因表达状态、识别新的动力学现象、分析基因回路中的生化相互作用以及阐释所搭建遗传回路的功能等^[24]。作为对比,基因微阵列技术仅分析基因组规模的群体平均表达水平;流式细胞术虽然能够高通量地获取单细胞基因表达数据,但并不能对同一个细胞的表达情况进行追踪。虽然采用荧光蛋白作为报告基因往往限制了此系统所能同时研究的基因数量,但是研究者仍能从有限数量的基因表达情况中获取有用的信息。

此外,由于为固体平板培养,细菌能获取的营养有限,不能利用这套系统进行更长时间的观察,因此基于琼脂糖平板的单细胞观察系统不能满足一些研究细菌适应性(如抗生素、氧气缺乏等条件)等需要更长时间培养观察实验的要求。

2.2 基于微流控芯片的单细胞观察系统

在过去的十几年里,微流控芯片技术的出现和发展为微生物学研究提供了极大的助力,尤其是多层软光刻技术的应用极大地降低了芯片制作的复杂度^[25]。传统的单细胞技术只能对少数几个细菌细胞样品进行几代时长的跟踪成像,并且无法为细胞提供持续稳定的生长环境^[26],而微流控技术能够为成百上千个细菌细胞在上百代的时间范围内提供一个非常稳定的生长环境,并且由于微流控设备体积小、设计灵活,因此能够非常方便地与高分辨延时显微成像系统集成在一起,实现长时间、高通量、高精度的细菌单细胞生理数据采集。目前最引人注目的单细胞分析微流控芯片是来自Suckjoon课题组设计的“mother machine”,它可以保证细菌细胞在一个稳定的培养环境中,长期处于稳定的对数生长状态^[27]。

如图1(c),“mother machine”的主要结构由一个两端开口的宽主通道加上侧边与之垂直、平行排列的大量子通道组成;这些子通道的一头与主通道相通,另一头是封闭的,并且其宽度仅能容纳一个细菌细胞,每个子通道就相当于一个单个细菌的微型培养室。在实验时主通道中一直源源不断地通新鲜培养基,通过扩散作用,主通道中新鲜培养基中的营养物质会进入子通道,而子通道中细胞产生的代谢废物会进入主通道随液流排出;随着培养时间的增长和细菌的不断分裂,细菌细胞会沿着子通道形成一条线,多余的子细胞会被挤出子通道到主通道中,并随着旧培养基一起被冲

走。我们的关注点在子通道封闭端的单个细胞,因为它的位置是最稳定的,即生长环境稳定保证其长期处于稳定状态;由于同一个子通道内所有细胞都是顶端位置细胞的克隆,故称封闭顶端的细胞为“母细胞(mother cell)”,其余则是“子细胞(daughter cell)”。

我们实验室利用“mother machine”的设计原理,根据相关实验需求进一步重新设计符合实验要求的微流控芯片,以便于在之后的实验中实时观察包括抗生素、低氧、温度^[29,30]等条件下细菌的生理学表现。同时,我们还搭建了自动化聚焦光学系统,结合单细胞捕获装置(微流控芯片)、流体控制系统(气泵、电磁阀、流量计等)、温度控制系统、高通量图像处理分析系统等,实现长时间(2 d以上)培养观察。在培养基准备充分、软硬件正常运行的条件下,细菌可以一直在一个稳定可控的条件下保持对数生长。

另外,还有研究者使用微腔室型的微流控芯片培养细菌,使其在芯片上单层生长(图1(b))^[31],并进行图像分析。但是使用芯片难以对大量分裂形成的不同“细胞系”的细菌细胞进行追踪,并且细菌的运动或培养环境的物理波动导致细胞的营养状态可能存在波动。实际上,有些很细的腔室设计也与“mother machine”的设计思路类似^[32]。

2.3 其他单细胞水平研究方法

以上两种研究方法,虽然经过广泛的使用与优化,在实验流程方面已经较为成熟,为细菌尺寸调控领域提供了有力的技术支持,但相对于其他传统的单细胞水平研究方法来说,出现时间相对较晚,仍旧属于新兴的方法学。传统的单细胞水平研究方法也较为丰富,例如基于荧光发光原理的荧光染料^[33]、荧光蛋白^[34]、寡核苷酸探针^[35]等,尤其是由此延伸而来的荧光原位杂交技术(fluorescence *in situ* hybridization, FISH),可以较为精细地描绘出单个细胞的内部行为与动态变化;流式细胞术可用来高通量快速分析细胞尺寸、细胞组分等;将关注从细胞内部转移到细胞表面——包括表面形态、力学、电化学等性质方面,可以通过原子力显微镜(atomic force microscope, AFM)^[36]与扫描电化学显微镜(scanning electrochemical microscopy, SECM)^[37]获得相关信息;利用机械^[38]、光学^[39]或电动力学^[40]原理,可实现对细菌的显微操作。除了直接“可观察”到的实验工具与方法,还有通过光谱学对细胞化学组成进行异质性分析的显微拉曼光谱技术^[41]、直接

分析细菌遗传信息的单细胞测序技术^[42,43].

3 单细胞水平细胞尺寸调控机制相关理论

在早期的研究中^[3], 研究人员所获取的细胞尺寸的数据是通过测量吸光度实现的, 而吸光度直接与细菌的细胞干重成正相关^[1], 也就是说, 此时细胞尺寸并非细胞物理形状的大小而是指细胞质量的高低. 虽然之前细胞尺寸的概念与现今并不相同, 但是这些研究给微生物生理学领域提供了大量的可靠数据, 打下了坚实的基础. 另外, 关于DNA复制与细胞分裂方面^[44,45], 尤其是分裂行为在时间与空间上的决定策略^[17], 也一直是一个传统的研究方向. 现在研究者们认为, 由于细菌分裂时细胞宽度基本保持不变, 因此一般以细胞长度代表细胞尺寸(图2(a)), 故研究的重点在于细菌细胞

如何维持长度的自稳态, 而不至于过长或者过短.

3.1 加法器模型

Christine课题组^[8]于2014年通过在琼脂板上培养新月柄杆菌和在带有微腔室结构的微流控芯片上培养大肠杆菌, 分析实验中处于不同细胞周期的细胞长度数据, 结果表明, 无论是对称分裂(大肠杆菌)还是不对称分裂(新月柄杆菌)的细菌, 都会在分裂发生前增加一个恒定不变的长度. 紧接着, Suckjoon课题组^[9]使用“mother machine”进行细菌单细胞的培养, 又从革兰氏阴性菌(大肠杆菌)和革兰氏阳性菌(枯草芽孢杆菌)的分类角度, 得出了相似的结论. Christine和Suckjoon课题组先后在单细胞水平开展了更加系统的细菌尺寸调控机制研究, 通过实验的确得出了与群体分析方法下

图 2 (网络版彩色)细菌在单细胞水平的尺寸调控^[10]. (a) 主要获取参数, 包括细胞初始长度、最终长度、世代时间以及生长速率等. (b) “加法器”模型示意图; 假设细胞稳态时长度为2 μm, 则无论是长度大于还是小于2 μm的细胞, 每次增加一个固定的2 μm长度后再分裂, 经过多代后, 细胞长度都会无限接近于2 μm. (c) “噪声线性谱”模型的数学模拟图: 细胞尺寸会随着分裂代数的增多呈现周期性振荡, 并收敛于定值

Figure 2 (Color online) Bacterial cell size regulation at single cell level^[10]. (a) Main parameters contain cell initial length, final length, generation time and grow rate. (b) “Adder” model: Assume that steady cell length is 2 μm. Both cells longer and shorter than 2 μm, their increments of cell length during one generation time is constant 2 μm. So after plentiful enough generations their cell length will be very close to 2 μm. (c) Model of the “noisy linear may”: Cell size will present periodic oscillation with generations and converge on a definite value

得到的“筛选器+计时器”模型截然不同的结果。“筛选器+计时器”模型强调分裂前细胞尺寸及生长周期与新生细胞尺寸不相关,但单细胞数据显示生长周期与新生细胞尺寸呈负相关,分裂前细胞尺寸与新生细胞尺寸成正相关。基于此发现,他们提出了一个现在被称为“加法器(adder)”模型的新理论:无论是对称分裂还是不对称分裂的单细胞细菌,都会通过增加一个固定的尺寸增量后再分裂,通过这种方法实现新生细胞尺寸差异的收敛,这个过程需要几代到十几代的时间,这种收敛的最终结果会使细胞尺寸的稳态得以维持(图2(b)),这个结果也正好与之前一些研究者对细菌尺寸调控机制的预测相吻合^[17]。

3.2 噪声线性谱模型

现在普遍认为,细菌细胞在生长过程中,总是经历着细胞内噪声的固有扰动,它影响了包括基因表达、人工设计的基因线路以及细胞分裂^[21,46]等细胞生命过程的方方面面。无论是面对内部的噪声扰动还是环境的外部波动,细菌细胞都有着调控维持自身尺寸稳态的能力。

同样是利用基于微流控芯片的单细胞数据采集和分析技术,我们在前期工作中发现总会有一部分细菌表现出在细胞尺寸上的周期性振荡现象,并且这种现象在不同菌种和不同培养条件下具有普遍性,基于此现象,我们提出了“噪声线性谱”模型(图2(c)所示)^[10]。这个模型强调细菌具有一种调控细胞尺寸的负反馈机制,即更大尺寸的新生细胞会更早分裂,更小尺寸的新生细胞会更晚分裂。数学表达为细胞长度的自相关函数

$$L_{(n+1)} = (a \times L_{(n)} + b + \eta) / 2, \quad (1)$$

其中, L 表示细胞起始长度, n 表示细胞代数, η 表示高斯白噪声, a 与 b 则反映了细菌细胞维持其稳态能力的强弱,可以通过分析数据模拟计算得到。对于不同的菌种还有培养条件(包括培养基组成、温度等)的改变,自相关函数的 a 和 b 都可以不一样。除了大肠杆菌,对其他已发表的论文数据的分析表明,枯草芽孢杆菌^[11]和酵母^[12]也符合噪声线性谱模型。

“噪声线性谱”模型认为,细菌控制细胞尺寸稳定性的能力是有强弱程度区别的,并且这种能力会随物种、菌种和培养条件的不同而发生变化,而“加法器”模型认为,细菌控制细胞尺寸稳定性的能力是不变的

恒定值,有可能“加法器”模型只是“噪声线性谱”模型中的一个特例($a=1$)。

4 总结与展望

总的来说,细菌的细胞尺寸调控机制研究是一个技术创新直接促进基础科学发展的典型案例^[47]。从常规培养到琼脂糖平板再到微流控芯片的使用,从“筛选器+计时器”到“加法器”与“噪声线性谱”,从群体平均水平到可捕获追踪任一细胞的单细胞水平,研究者对研究对象的分辨率逐渐增大,能够进一步获取大量细菌处于正常生长状态下的实验数据。同时,微流控芯片和自动化光学成像系统的使用,基本以自动代替人工实现了实验中取样的工作,节约了许多重复繁琐工作量;这个“取样”过程甚至并不直接与观察的实验样品接触,从而极大地减少“观察者效应”对实验结果的影响^[48]。

近来,有研究者提出了“下一代细菌生理学研究技术”的概念^[49],本质上是一套在单细胞水平研究细菌生态生理学的技术组合。其核心在于对同一个目的样品(活细胞)进行的表型观察与研究是非破坏性的,影响极小,使得在进行诸如基因组、蛋白质组等下游分析时不会受到上一步实验的影响。基于这个概念,除了主要利用光学显微镜的表型研究外,还有拉曼显微光谱技术和生物正交非范式氨基酸标记(bioorthogonal non-canonical amino acid tagging, BONCAT)。拉曼显微光谱技术可以根据与数据库对比确认已知拉曼键的化合物,研究细菌细胞中自发荧光物质^[50]、孢子形成^[51]、化合物储存^[52]等。而BONCAT能够利用叠氮-炔基点击化学来生物正交地标记细胞组分,目前较为成熟的标记对象是蛋白质^[53],主要用在蛋白质的从头合成,进一步用来筛选各种物理化学因子或生长基质对细胞、种群或群落活动的作用^[54]。BONCAT尤其适用于研究非同化代谢途径或难以获取同位素标记底物的情况。

目前从单细胞水平观察系统获取的输出信息种类较为有限,主要是荧光图像或明场图像。经过图像分析,研究者能绘制出较长一段时间内细菌细胞的某些动态信息图谱。但是这些有限种类的输出信息,已经值得我们去进一步分析解读,其中隐藏的生物规律还有待挖掘。随着我们对这些信息解读的初步完成,相信单细胞相关的实验技术也会随着研究者需求而不断发展。

参考文献

- 1 Monod J. The growth of bacterial cultures. *Annu Rev Microbiol*, 1949, 3: 371–394
- 2 Turner J J, Ewald J C, Skotheim J M. Cell size control in yeast. *Curr Biol*, 2012, 22: R350–R359
- 3 Schaechter M, Maaloe O, Kjeldgaard N O. Dependency on medium and temperature of cell size and chemical composition during balanced growth of *Salmonella typhimurium*. *J Gen Microbiol*, 1958, 19: 592–606
- 4 Wallden M, Fange D, Lundius E G, et al. The synchronization of replication and division cycles in individual *E. coli* cells. *Cell*, 2016, 166: 729–739
- 5 Donnan L, John P C L. Cell cycle control by timer and sizer in chlamydomonas. *Nature*, 1983, 304: 630–633
- 6 Osella M, Nugent E, Cosentino Lagomarsino M. Concerted control of *Escherichia coli* cell division. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111: 3431–3435
- 7 Iyer-Biswas S, Wright C S, Henry J T, et al. Scaling laws governing stochastic growth and division of single bacterial cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111: 15912–15917
- 8 Campos M, Surovtsev I V, Kato S, et al. A constant size extension drives bacterial cell size homeostasis. *Cell*, 2014, 159: 1433–1446
- 9 Taheri-Araghi S, Bradde S, Sauls J T, et al. Cell-size control and homeostasis in bacteria. *Curr Biol*, 2015, 25: 385–391
- 10 Tanouchi Y, Pai A, Park H, et al. A noisy linear map underlies oscillations in cell size and gene expression in bacteria. *Nature*, 2015, 523: 357–360
- 11 Moffitt J R, Lee J B, Cluzel P. The single-cell chemostat: An agarose-based, microfluidic device for high-throughput, single-cell studies of bacteria and bacterial communities. *Lab Chip*, 2012, 12: 1487–1494
- 12 Nobs J B, Maerkl S J. Long-term single cell analysis of *S. pombe* on a microfluidic microchemostat array. *PLoS One*, 2014, 9: e93466
- 13 Walsh C, Wencewicz T. Antibiotics: Challenges, Mechanisms, Opportunities. New Jersey: John Wiley & Sons, 2016
- 14 Weitz J S, Poisot T, Meyer J R, et al. Phage-bacteria infection networks. *Trends Microbiol*, 2013, 21: 82–91
- 15 Cabiscol E, Tamarit J, Ros J. Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species. *Int Microbiol*, 2000, 3: 3–8
- 16 Facchetti G, Chang F, Howard M. Controlling cell size through sizer mechanisms. *Curr Opin Syst Biol*, 2017, 5: 86–92
- 17 Donachie W D. Relationship between cell size and time of initiation of DNA replication. *Nature*, 1968, 219: 1077–1079
- 18 Donachie W D, Begg K J, Vicente M. Cell length, cell growth and cell division. *Nature*, 1976, 264: 328–333
- 19 Elowitz M B. Stochastic gene expression in a single cell. *Science*, 2002, 297: 1183–1186
- 20 Anonymous. Single-cell microbiology. *Nat Biotechnol*, 2016, 34: 1077
- 21 Eldar A, Elowitz M B. Functional roles for noise in genetic circuits. *Nature*, 2010, 467: 167–173
- 22 Levine J H, Fontes M E, Dworkin J, et al. Pulsed feedback defers cellular differentiation. *PLoS Biol*, 2012, 10: e1001252
- 23 Young J W, Locke J C W, Altinok A, et al. Measuring single-cell gene expression dynamics in bacteria using fluorescence time-lapse microscopy. *Nat Protoc*, 2011, 7: 80–88
- 24 Locke J C W, Elowitz M B. Using movies to analyse gene circuit dynamics in single cells. *Nat Rev Microbiol*, 2009, 7: 383–392
- 25 Unger M A. Monolithic microfabricated valves and pumps by multilayer soft lithography. *Science*, 2000, 288: 113–116
- 26 Yin H, Marshall D. Microfluidics for single cell analysis. *Curr Opin Biotech*, 2012, 23: 110–119
- 27 Wang P, Robert L, Pelletier J, et al. Robust growth of *Escherichia coli*. *Curr Biol*, 2010, 20: 1099–1103
- 28 Ma Z, Chu P M, Su Y, et al. Applications of single-cell technology on bacterial analysis. *Quant Biol*, 2019, 7: 171–181
- 29 Ratkowsky D A, Olley J, McMeekin T A, et al. Relationship between temperature and growth rate of bacterial cultures. *J Bacteriol*, 1982, 149: 1–5
- 30 Ratkowsky D A, Lowry R K, McMeekin T A, et al. Model for bacterial culture growth rate throughout the entire biokinetic temperature range. *J Bacteriol*, 1983, 154: 1222–1226
- 31 Mather W, Mondragón-Palomino O, Danino T, et al. Streaming instability in growing cell populations. *Phys Rev Lett*, 2010, 104: 208101
- 32 Hashimoto M, Nozoe T, Nakaoka H, et al. Noise-driven growth rate gain in clonal cellular populations. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2016, 113: 3251–3256
- 33 Mason W T. Fluorescent and Luminescent Probes for Biological Activity: A Practical Guide to Technology for Quantitative Real-Time Analysis. New York: Academic Press, 1999
- 34 Rodriguez E A, Campbell R E, Lin J Y, et al. The growing and glowing toolbox of fluorescent and photoactive proteins. *Trends Biochem Sci*, 2017, 42: 111–129
- 35 Dunn M R, Jimenez R M, Chaput J C. Analysis of aptamer discovery and technology. *Nat Rev Chem*, 2017, doi: 10.1038/s41570-017-0076
- 36 Yao X, Walter J, Burke S, et al. Atomic force microscopy and theoretical considerations of surface properties and turgor pressures of bacteria. *Colloids Surfs B-Biointerfaces*, 2002, 23: 213–230
- 37 Cai C, Liu B, Mirkin M V, et al. Scanning electrochemical microscopy of living cells. 3. *Rhodobactersphaeroides*. *Anal Chem*, 2002, 74: 114–119

- 38 Fröhlich J, König H. Rapid isolation of single microbial cells from mixed natural and laboratory populations with the aid of a micromanipulator. *Systatic Appl Microbiol*, 1999, 22: 249–257
- 39 Ericsson M, Hanstorp D, Hagberg P, et al. Sorting out bacterial viability with optical tweezers. *J Bacteriol*, 2000, 182: 5551–5555
- 40 Hughes M P. AC electrokinetics: Applications for nanotechnology. *Nanotechnology*, 2000, 11: 124–132
- 41 Schuster K C, Urlaub E, Gapes J R. Single-cell analysis of bacteria by Raman microscopy: Spectral information on the chemical composition of cells and on the heterogeneity in a culture. *J Microbiol Methods*, 2000, 42: 29–38
- 42 Gawad C, Koh W, Quake S R. Single-cell genome sequencing: Current state of the science. *Nat Rev Genet*, 2016, 17: 175–188
- 43 Saliba A E, Li L, Westermann A J, et al. Single-cell RNA-seq ties macrophage polarization to growth rate of intracellular Salmonella. *Nat Microbiol*, 2016, 2: 16206
- 44 Schaechter M, Williamson J P, Hood J R, et al. Growth, cell and nuclear divisions in some bacteria. *J General Microbiol*, 1962, 29: 421–434
- 45 Cooper S, Helmstetter C E. Chromosome replication and the division cycle of *Escherichia coli*. *J Mol Biol*, 1968, 31: 519–540
- 46 Huh D, Paulsson J. Random partitioning of molecules at cell division. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108: 15004–15009
- 47 Jun S, Si F, Pugatch R, et al. Fundamental principles in bacterial physiology—History, recent progress, and the future with focus on cell size control: A review. *Rep Prog Phys*, 2018, 81: 056601
- 48 Holman L, Head M L, Lanfear R, et al. Evidence of experimental bias in the life sciences: Why we need blind data recording. *PLoS Biol*, 2015, 13: e1002190
- 49 Hatzenpichler R, Krukenberg V, Spietz R L, et al. Next-generation physiology approaches to study microbiome function at single cell level. *Nat Rev Microbiol*, 2020, 18: 241–256
- 50 Song Y, Kaster A K, Vollmers J, et al. Single-cell genomics based on Raman sorting reveals novel carotenoid-containing bacteria in the Red Sea. *Microb Biotechnol*, 2017, 10: 125–137
- 51 Chan J W, Esposito A P, Talley C E, et al. Reagentless identification of single bacterial spores in aqueous solution by confocal laser tweezers Raman spectroscopy. *Anal Chem*, 2004, 76: 599–603
- 52 Fernando E Y, McIlroy S J, Nierychlo M, et al. Resolving the individual contribution of key microbial populations to enhanced biological phosphorus removal with Raman–FISH. *ISME J*, 2019, 13: 1933–1946
- 53 Shieh P, Siegrist M S, Cullen A J, et al. Imaging bacterial peptidoglycan with near-infrared fluorogenic azide probes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111: 5456–5461
- 54 Hatzenpichler R, Connon S A, Goudeau D, et al. Visualizing *in situ* translational activity for identifying and sorting slow-growing archaeal–bacterial consortia. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2016, 113: E4069–E4078

Summary for “单细菌捕获技术应用于细菌尺寸调控规律”

Applying single-cell capture technologies to studies of bacterial cell-size regulation

Zhixin Ma^{1,2†}, Hui Wen^{1†}, Yaxin Shen¹, Haojie Cao¹, Yufang Deng¹, Fan Liang¹, Yue Yu¹,
Chenli Liu^{1,2*} & Shuqiang Huang^{1,2*}

¹ CAS Key Laboratory of Quantitative Engineering Biology, Guangdong Provincial Key Laboratory of Synthetic Genomics, Shenzhen Institute of Synthetic Biology, Shenzhen Institutes of Advanced Technology, Chinese Academy of Sciences (CAS), Shenzhen 518055, China;

² School of Computer Science and Technology, University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

† Equally contributed to this work

* Corresponding authors, E-mail: cl.liu@siat.ac.cn; shuqiang.huang@siat.ac.cn

Under certain culture conditions, bacterial cell size can be stabilized within a certain range. Briefly, after several generations, longer cells become shorter as shorter cells become longer. This steady state phenomenon, known as cell-size homeostasis, is even observed in bacterial cells subjected to environmental fluctuations or internal noise. The scientific laws that govern cell size regulation, and the biological significance behind these laws, has long been an attractive research topic, and is one that continues today. In recent years, studies at the population level have failed to fully explain some phenomena; thus, the current trend is to explore the laws of cell-size control by following bacteria at the single-cell level. Thanks to the development of various single-cell capture technologies, it has become more feasible for researchers to carry out such research relatively easily. The results of studies of bacterial size regulation using single-cell data are inconsistent with those obtained from batch culture studies, with the former more accurately reflecting information that covers the entire population than the latter. In this review, we start by introducing bacterial single-cell capture technologies that are mainly based on long-term time-lapse microscopy. The “capture” in this context means that not only are the bacterial cells being manipulated, but that each of the traced cells is also providing phenotype information. To improve the accuracy of the results, non-destructive methods are used to minimize the impact on the growth of cells, notably by using an effective type of microfluidic chip known as the “mother machine”. Bacterial cells in the mother machine can obtain continuous fresh medium through liquid flow, allowing the observation of these living cells for long time periods. This approach is also expected to be beneficial for future downstream analysis. Next, we relate several size-control models of various bacteria: Sizer, timer, adder and noisy linear map. The sizer and timer models make sense at the population level, with each proposing that cells will divide at a specific cell size or time point, respectively. At the single-cell level, the adder and noisy linear map models offer their own explanations for maintaining cell-size homeostasis. Ultimately, all of the cells in a population get increasingly close to a specific common size over many generations. In summary, this article provides a quick overview of current trends and recent progress in bacterial cell-size regulation.

single-cell capture technologies, cell-size regulation, bacterial physiology, microfluidics

doi: [10.1360/TB-2020-0453](https://doi.org/10.1360/TB-2020-0453)