###

发布

GB/T XXXXX—201X

中华人民共和国国家标准

ICS 07.080

A 21

工业微生物菌株生长表型评价 微液滴浊度法

**Evaluation of the growth phenotype of the industry microorganism strain——Microdroplet turbidity**

（征求意见稿）



发布

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局

中国国家标准化管理委员会

201X-XX-XX 发布

201X-XX-XX实施

前 言

本标准按照GB/T 1.1—2009给出的规则起草。

本标准由中国标准化研究院提出并归口。

本标准起草单位：

本标准主要起草人：

工业微生物菌株生长表型评价 微液滴浊度法

1 范围

本标准规定了工业微生物菌株质量评价微液滴浊度法的原理、试剂材料、仪器设备、操作步骤、结果分析。

本标准适用于工业微生物菌株生长表型评价。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件，仅所注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB/T 6682-2008 分析实验室用水规格和试验方法

3 原理

通过将微生物细胞限域在液滴中，利用微球中的面积进行生长速率计算和评价。

4 试剂材料

除特殊说明外，本标准所用试剂均为分析纯，水均为符合 GB/T 6682中规定的二级水。

4.1 基础培养基

按照GB/T 15818中方法配制。或选用商品化的预制干燥培养基，严格按照商品说明书加水配制。

5 仪器设备

5.1 单细胞拉曼光谱测试系统：532nm激光，输出强度不低于100mW，800mm长焦，600刻线光栅，100倍物镜，光谱分辨率不低于2cm-1，波数范围需包含“指纹区”，即390 cm-1～1800 cm-1。

5.2 离心机，500～4000 rpm/min。

5.3 显微镜：100～400倍，带CCD成像模块

5.4 无菌EP管：容量1.5毫升。

5.5 微量移液器及枪头：1毫升，200微升，10微升。

5.6 聚四氟乙烯管：内径0.5 mm，外径1.59 mm。

6 操作步骤

6.1 LB培养基的制备

配制每升培养基,应该在950 mL去离子水中加入:胰蛋白胨10 g、酵母提取物5 g、NaCl 10g，摇动容器直至溶质溶解。用5 mol/L NaOH调pH至7.0。用去离子水定容至1 L。在121℃蒸汽高压灭菌20 min。

6.2 微生物菌株菌液制备

从琼脂平板挑取微生物菌株单克隆于5 mL LB培养基中，在37 ℃、220 rpm摇床中培养过夜。取1 mL的培养液3000 rpm离心2 min去除上清后加入PBS溶液，重复清洗3次。

6.3 微生物菌液浓度选取

用LB培养基稀释含有PBS的菌液3000倍，得到细胞悬液浓度约为6×105 CFU/mL。

6.3 琼脂糖溶液制备

用分析天平称取0.02 g超低熔点琼脂糖A5030，并向其中加入1 mL已灭菌的LB培养基，加热溶解，配制成2%(g/v)的溶液。趁热用0.22 μm的无菌滤膜过滤，备用。

6.4 微流控芯片制作

用AutoCAD设计微流控芯片通道图形，其中分散相的宽度为40 μm，连续相的宽度为60 μm。制备出分辨率为24500 DPI的芯片结构掩膜。

制作芯片结构硅片，包括匀胶、前烘、曝光、后烘、显影步骤。

PDMS微流控芯片制作，同时制作出两个芯片，一个用于待鉴定菌株，另一个用于工业标准菌株。

6.5 单细胞液滴的产生

分别将两种菌株稀释到6×105 CFU/mL细胞与超低熔点琼脂糖溶液混匀。

取一块芯片，将两个100 μL的枪头分别插在芯片的油相入口和水相入口，连续相为氟碳油，分散相为低熔点琼脂糖菌液，然后将聚四氟乙烯管连接出口与注射器。

将芯片放在温控系统，范围在30 ℃到37 ℃内，将注射器的活塞用夹子固定在注射器2 mL的位置，开始发生液滴。

取另一块芯片重复上述步骤。

6.6 单细胞液滴的培养与生长表型评价

液滴发生结束后，移除芯片上的枪头和管子后，将两芯片放入4 ℃冰箱冷凝20 min后再置入盛有水的培养皿中入37 ℃恒温箱进行培养6 h。

培养后的琼脂糖微球使用倒置显微镜在10X物镜成像进行成像，获取的图片保存为bmp格式并用软件进行计数。

根据两块芯片内微球中的面积进行生长速率的计算。获取的数据经过对数转换后进行统计学分析。

6.7 工业菌株微生物的宏观培养验证

将目标液滴通过PEEK软管收集到EP管中，加入破乳试剂对液滴进行破乳。析出底层菌液加入LB培养基中放入摇床培养12 h,稀释到适宜浓度后进行涂布培养。

7 结果分析

筛选菌株与参考菌株的生长速率差异按式（1）计算：

………………………………….（1）

式中：

*D*——标准信号差值；

*X*——表示图像中微球细菌的面积；

*R*——表示微球直径；

*N*——表示凝胶微球的个数。

\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_