### 

GB/T XXXXX—201X

中华人民共和国国家标准

ICS 07.080

A 21

微生物高通量适应性进化

微流控芯片法

**High-throughput microbial adaptive evolution**

**methods based on microfluidic chip**

（征求意见稿）



**国家市场监督管理总局**

**中国国家标准化管理委员会**

发布

发布

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：

微生物高通量适应性进化测定 微流控芯片法

1 范围

本标准规定了微生物高通量适应性进化测定微流控芯片法的原理、试剂或材料、仪器设备、测定步骤和结果分析。

本标准适用于大肠杆菌、酿酒酵母、毕赤酵母、扭脱甲基杆菌、谷氨酸棒状杆菌等微生物的高通量适应性进化。

2 规范性引用文件

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法。

GB/T 27990 生物芯片基本术语。

3 术语与定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

适应性进化 adaptive evolution

利用微生物繁殖迅速这一特征，在实验室条件下通过对微生物在某一特定环境下进行连续传代培养，来模拟微生物对环境的长期适应的过程。

3.2

微流控技术 microfluidic

是一种在微米量级的微小通道中精确控制和操控微尺度流体的技术。

3.3

微液滴技术 mircodroplets

通过加入适量表面活性剂，一种液体可以以极小的微滴的形式分散在另一与之不相溶的液体中，形成高度分散的热力学稳定体系。

注：根据分散相和流动相的不同，微滴可分为两种：W/O型即以油相为连续相、水相为分散相的油包水型微滴和与之相对的O/W型微滴。

3.4

选择压力 selection pressure

指外界施与的能改变适应性进化过程前进方向的压力，如温度、溶剂耐受性、毒性底物等，亦称胁迫因子。

4 原理

在液滴微流控芯片上生成培养基包裹菌体的微液滴，以无菌的环境配以合适的温度、溶氧，通过液滴的运动往复培养使微生物在芯片上生长繁殖的同时维持正常的结构和功能，通过液滴分割融合的操作单元来实现培养基的不断补充和更换，实现连续传代的目的。通过上述操作，实现微生物的适应性进化，从而获得生长速率提高，或者对特定环境获得耐受性提高的菌株。

5 试剂或材料

除非另有规定，仅使用分析纯试剂。

5.1 水：GB/T6682二级。

5.2 培养基

根据不同菌株的需求配置相应的培养基，高压灭菌后置于4摄氏度冰箱保存备用（固体培养基在液体的基础上加15 g/L琼脂粉）。

5.3 油相

配制含10 g/L Span®80的矿物油作为液滴生成的油相，混合均匀，室温保存备用。

6 仪器设备

6.1 分析天平：精度为0.0001g和0.01g。

6.2 恒温金属浴加热套：温度范围为4-100℃，精度为0.1℃。

6.3 恒流蠕动泵：流速为1ul/min-1ml/min。

6.4 光纤光谱仪：波长检测范围350nm-800nm。

6.5 数控雕刻机：转速24000RPM。

6.6 恒温热压机：60-80℃。

6.7 进样瓶3个：容量约12ml。

7 测定步骤

**7**.1 菌体准备与培养

7.1.1 菌体准备

从冻存管中蘸取一接种环菌液涂布于固体培养基上活化，在菌体最适生长温度下培养。

7.1.2 菌体培养

在超净工作台中，酒精灯火焰附近挑取在固体培养基上培养好的单菌落放入液体培养基中，放入菌体最适温度的恒温摇床。设置合适的转速、温度和培养时间，培养菌体至稳定期。

7.2 进样瓶准备

准备三个进样瓶，编号2、4、6号进样瓶。2号进样瓶用来装菌株悬浮液，4号和6号进样瓶用来装装新鲜培养基和含有一定浓度胁迫因子的培养基。将准备好的进样瓶清洗并在121℃，15min下高温灭菌。

准备新鲜培养基和含不同浓度胁迫因子的培养基各5-10 ml。准备用无菌培养基稀释至2%的生长到稳定期的菌3-5ml，用无菌针管先向三个进样瓶侧管注入1-2ml 油相。注射完毕旋转进样瓶，让油相浸湿整个进样瓶内部，以同样方式注入菌液约3-4mL或培养基6-8ml，最后注入油将进样瓶装满，拔出进样针及其连接头。

7.3 微生物连续培养芯片制作

芯片材料使用聚甲基丙烯酸甲酯（PMMA）。使用Auto-CAD软件作出芯片管道的结构图，按照芯片设计图使用雕刻芯片管道并钻孔，同时额外刻制一块仅打磨平面、无管道的芯片。使用大量清水和75%乙醇冲洗雕刻好的两块芯片，保证管道内无毛刺。

将两块芯片对齐贴合并将75%乙醇通入使之充满管道与两块芯片的接触面，使用恒温热压机将芯片在65-75 °C下压合2 min。如压合效果不理想则再次通入75%乙醇，适当提高压合温度和压合时间，重复压合。待压合后的芯片冷却降温后，使用快速粘结剂将外径为700 μm的金属管插入芯片上的孔内并粘接固定。待粘结剂固化后芯片即可使用（使用前需用油相在低流速下润洗管道）。

7.4 微生物连续培养微流控平台的搭建

芯片C1和C3口外连两套约1.5m长管路，为菌株主培养通道。C1口外长管路上设有光纤光谱仪检测区域，可持续在线检测获得液滴内菌体的OD值。C5口的管道用于补油，以控制两相长度。C2口外的进样瓶用于菌株悬浮液进样，C4和C6外的两个进样瓶分别装有新鲜培养基和含有一定浓度胁迫因子的培养基。进样瓶选用具有顶管和侧管的液压瓶，其中顶管在液压瓶的中心，与液压瓶的顶部恰好连通；侧管则较靠近瓶壁，贯穿液压瓶顶部，直达液压瓶底部。顶管与泵连接，侧管与芯片连接。CF口连接的电磁阀控制着系统总出口，可排出废液至废液瓶。除CF口外，每个管道上都接有一个恒流蠕动泵作为注射泵。1-6号注射泵的一端接入矿物油进样瓶，用于平台各管道内的油相进样。选用具有三通管道的注射泵，其具有三种状态：当处于O状态时，注射泵的注射器和矿物油进样瓶连通，注射器可吸取油；当处于I状态时，注射泵的注射器和芯片连通，注射器可推出油；当处于B状态时，芯片和矿物油进样瓶连通，泵对应的芯片通道口打开，通道处于通路状态。

整个平台可装进一个密闭箱体，以便于控制培养温度。3个进样瓶置于恒温金属浴加热套中，芯片和管道置于恒温金属浴加热套上，以便使样品和液滴的温度尽快到达培养温度。使用空气加热器来控制环境温度，减少液滴与环境的换热，更加准确地控制温度。配置温度计来读取箱体内的温度。

7.5 液滴识别和编号

在生成液滴后，可通过油水检测激光来识别液滴。识别的原理主要是基于油相和水相的激光折射率之间的差异。当油相经过芯片上的激光检测区时，油水检测激光将读取到一个较低的光压值（一般低于1）；当液滴经过芯片上的激光检测区时，油水检测激光将读取到一个较高的光压值（一般高于3.2）。通过光压值的大小对比可识别出液滴。由于激光是连续检测的，因此可以对液滴进行编号，并测出液滴的长度。

7.6 液滴生成

所有泵的初始状态为O状态且泵的注射器都吸满油。将3号泵切换至B状态，2号泵切换至I状态推出菌株悬浮液至通道交叉口处，然后将1号泵切换至I状态推出油相，利用油相的剪切力来阻断菌株悬浮液（即水相）而得到油包水型的液滴。利用2号泵和1号泵交替推出水相和油相，通过控制泵推出两相的时间和速度，可控制液滴的长度，实现液滴的生成。

7.7 菌体芯片培养和生长状况监测

在生成液滴后，将2号泵切换至O状态。可定义液滴在芯片主通路中的正反向运动。正向运动指的是3号泵处于B状态，1号泵推出油相使液滴在主通路中定向运动；反向运动指的是1号泵处于B状态，3号泵推出油相使液滴在主通路中定向运动。利用1、3号泵的交替切换可以使液滴在主管道内进行正反向的往复运动，进行液滴往复运动培养过程。在往复运动过程中液滴会发生一定的自旋转运动，以达到促进微滴内部混合的目的。液滴往复运动的单程时间和往复运动的流量均可使用蠕动泵设定。

液滴在每次定向运动过程中，都可以通过激光检测区进行识别和编号。而液滴在每次反向运动时，可以对液滴之间的距离进行校正。当两个液滴之间的距离短于设定距离时，可将5号泵切换至I状态进行补油；当两个液滴之间的距离长于设定距离时，可将5号泵切换至B状态，3号泵将多余的油从C5口推出。对液滴距离进行校正的好处在于可以防止液滴在运行过程中自行融合，维持液滴运行的稳定性。

液滴在进行反向运动经过光纤光谱仪检测区域时，可进行菌体浓度的检测。检测区域两端分别连接固定有光纤光谱仪的光源光纤与接收光纤，液滴经过检测区域时会吸收掉部分光纤光谱仪光源发出的光，剩余的光进入接收光纤。根据标定的空白样品吸收光强度可计算出该液滴的吸光度数值并实时反馈到与光纤光谱仪配套的计算机中。根据波长600 nm处液滴的吸光度可折算出液滴内菌体的浓度，并以此评价菌体的生长状态。

7.8 液滴分割和融合

在液滴进行正向运动时可进行液滴的分割和融合操作。当检测到液滴后，1号泵将液滴推至C5补油通道和主通道的交界处，然后将5号泵切换至I状态，从垂直方向注入油相，利用油相剪切力可将液滴进行分割（该过程可用PLC控制器控制油相注入的时间和速度，实现液滴的定量分割）。被分割开的部分液滴可以通过打开电磁阀而被排到废液瓶里，剩下的部分液滴可进行后续的液滴融合操作。

施加电场可以促进液滴融合。当施加特定电场时，电场会使得液滴表面的表面活性剂不稳定，从而导致液滴融合。在分割完液滴后，通过4或6号泵可以把新鲜培养基或含有一定浓度胁迫因子的培养基推至主通道处，然后给电极通电产生电场，以促进新鲜培养基或含有一定浓度胁迫因子的培养基和剩下的部分液滴进行融合。该过程可用PLC控制器控制新鲜培养基和含有一定浓度胁迫因子的培养基的体积和融合比例，实现含有不同浓度胁迫因子的培养基与剩余液滴的融合操作，并保持液滴体积和分割前体积相同。生成的液滴继续往复运动，实现液滴内菌体的传代恒化培养和适应性进化。

7.9 液滴提取

可根据需求提取目标液滴。根据油水检测激光确定的液滴编号，选择需要提取的液滴。在液滴正向运动过程中，不需要的液滴经过激光检测区时，其运行状态不变，无阻通过；而需要的液滴经过激光检测区时，3号泵切换至O状态，打开电磁阀，将液滴排出到CF口，移开废液瓶，用无菌冻存管接收保存。重复运行此操作，可将目标液滴逐个收集。

7.10 清洗

实验完成后，打开电磁阀，1号泵或3号泵切换到I状态并快速推出油相，将主管道内的液滴排出到废液瓶内并冲洗主管道。1、3号泵交替切换，反复冲洗主管道10min。芯片在清洗并经过紫外灯照射灭菌后，可重复使用1-2次。

8 结果分析

根据微滴内微生物生长状况监测数据绘制不同传代批次时微生物生长随时间变化曲线，随着传代批次的增加，液滴内微生物在600 nm处液滴的吸光度为1时所消耗的时间变短，则视为该微生物在所采用的培养条件下实现了适应性进化。

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