**《微生物高通量适应性进化测定 微流控芯片法》国家标准**

**编 制 说 明**

（征求意见稿）

一、任务来源

本国家标准的制定任务列入国家标准化管理委员会2018年第三批国家标准制修订计划，项目编号“20182191-T-424”。该标准由中国标准化研究院提出并归口，由清华大学等单位承担该标准的制定任务。

二、标准制定目的和意义

本标准规定了用微流控芯片法进行微生物高通量适应性进化的的原理、试剂材料、仪器设备、操作步骤和结果分析方法。通过逐渐自动添加化学因子梯度完成菌种适应性进化实验。通过自动测量菌种生长曲线情况，对大肠杆菌、酿酒酵母、毕赤酵母、甲基扭托杆菌、谷氨酸棒状杆菌等微生物进行高通量筛，从而打造一个便捷、快速、精准、高效的微生物实验平台。

随着微生物生产规模和产品品种不断增加，成为现代医药、生物、食品、环境、化工、农业等领域的重要生产方式。优质的工业菌株是微生物生产的灵魂和命脉，尽管现代生物技术在基因工程和代谢工程领域内的长足进展，通过诱发变异、基因重组和培养能够得到高产菌株。然而这是一个复杂的生化过程，除了微生物的本身性能，还与外界条件和菌株状态等诸多因素密切相关，具有高度的非线性、时变性和复杂性。如何能快速有效筛选出特定目标表型的高质量微生物仍然是微生物工业领域的瓶颈问题之一，因此对微生物进行高通量适应性进化日益受到重视。

微生物培养通常以摇瓶、多孔板、深孔板等容器为主，并配合摇床使用等操作。尤其在此过程中，人力依赖严重、过程繁琐复杂、污染风险大。而用微流控芯片法进行微生物高通量适应性进化是基于液滴微流控技术研发而成的一款微生物培养系统。具有高通量、自动传代、化学因子梯度添加、在线检测液滴光谱、微生物分选等功能。能充分保证微生物生长过程中的溶氧、混合和质能交换等需求，通过光谱检测指标对微液滴内的微生物可进行传代、多梯度化学因子添加等种操作，能实现菌种生长曲线测定、自动传代、梯度化学因子添加观察细菌耐药性状况、通过逐渐增加化学因子梯度以完成菌种适应性进化实验等，旨在为不同工业微生物菌株提供生长曲线和适应性进化的高通量方法。

三、标准制定原则

**（一）标准编制原则**

本标准以现有国内外相关标准规范为基础，与现行国家标准和行业标准相衔接，主要对用微流控芯片法进行微生物高通量适应性进化的标准方法和流程进行规范，选择既不影响微生物生长，又能自动化的检测的条件指标，旨在为不同工业微生物菌株提供一个统一、通用的生长曲线和适应性进化方法。

**（二）标准制订主要依据**

1、标准编写遵循GB1.1-2009《标准化工作导则 第1部分：标准的结构和编写规则》的有关要求。

2、标准编写内容参考的相关标准，包括：

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法。

GB/T 27990-2011生物芯片基本术语。

GB/T 14926.43-2001 实验动物细菌学检测染色法、培养基和试剂

3、法律、法规及文件

《中华人民共和国标准化法》

《中华人民共和国标准化法实施条例》

《国家标准化体系建设发展规划（2016—2020年）》

《深化标准化工作改革方案》

四、标准主要技术内容

本标准规定了恒化培养芯片、微流控恒化培养平台原理及搭建方法；微生物高通量适应性进化仪器设备及器具、主要试剂、操作步骤和结果分析。

主要技术：

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。其构建于面积为平方厘米级的芯片上，在尺度为几十到几百微米的通道和构件中承载体积为纳升、皮升甚至更小的流体。

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。微滴的形成类似于乳化现象。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。

**五、主要工作过程**

1、成立标准起草工作组

《微生物高通量适应性进化——基于微流控芯片方法》项目组与2016年接到编制任务。随即制定出了工作程序和工作计划。2016年下半年开始征集参与标准的单位，其中参与验证试验的有清华大学、上海交通大学、天津科技大学、江南大学。

2、调查研究工作

在制定标准的过程中，我们查阅了大量国内外相关标准，对标准进行了分析汇总，在国内还未发现有相关标准出现。

3、编写过程说明

研究了GB/T 6682 《分析实验室用水规格和试验方法》、GB/T 27990-2011《生物芯片基本术语》。了解了微流控培养的相关要求，同时收集查阅了相关资料。为了使编制的标准能更好的适用微生物高通量定向进化-筛选的应用，同时有效地促进微生物培养效率的提高，在2016年10月提出了标准讨论提纲，确定了编制原则和主要内容。该标准于2017年10月在全国标准信息公共服务平台上进行公示，于2018年2月召开专家会，听取专家意见。

**六、方法验证及结果**

方法验证1：微生物连续培养培养微流控平台

方法验证1.1：微生物连续培养芯片

验证过程：芯片两端设计Y型通道，利用水、油两相在Y型通道交叉处的剪切力作用可生成油包水的液滴。芯片上通道需足够长，以实现在芯片上多个液滴的往复运动即菌体的高通量培养，可通过设计弯曲的管道实现。芯片中部设计约1cm长的检测区域，两边留出插入光纤及光源的孔槽，便于实时检测液滴内菌体浓度。芯片中部分别设计十字型通道和T字型通道，同时留出灌锡的凹槽，以实现液滴的分割和介电融合。为便于控制其长度以满足实验要求，可使用PLC控制器控制水相和油相的电磁阀交替开启并循环，通过改变电磁阀开启和关闭的时间，可以任意控制两相的长度。芯片有11个外接口，6个连泵，其中1，3,5直接连泵；2,4,6连液压瓶再连泵。4个对称连两套约1.5m长管路，为主培养通道。1个连电磁阀，为系统总出口。芯片主通路从1号泵出发到1号长管路再到2号长管路，最后到3号泵，左右往复。示意图如图1示。

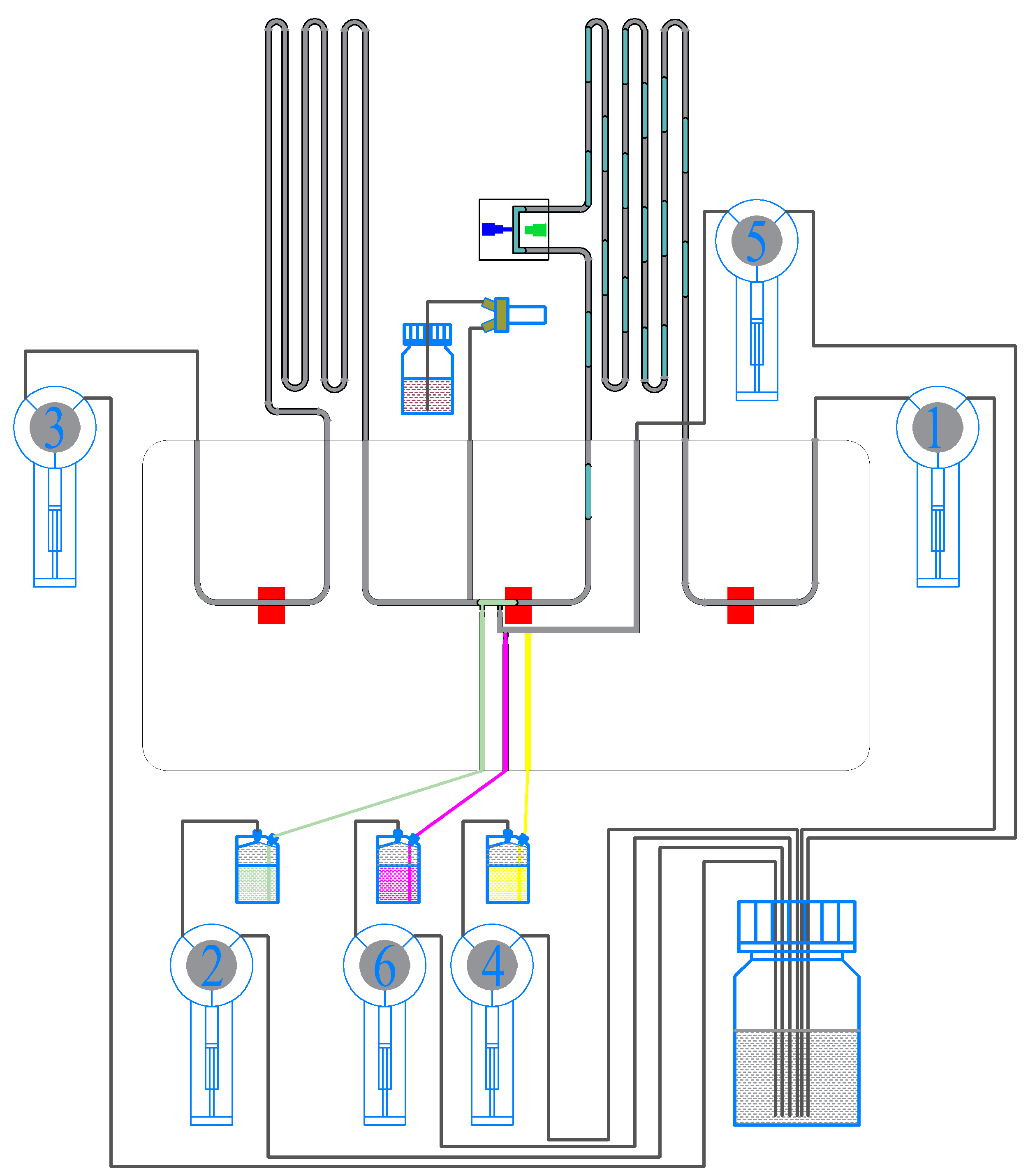


图1.MMC芯片连接示意图

方法验证1.2：液滴生成

验证过程：在3号蠕动泵（即通路口）连接B口。如图2所示利用蠕动泵将液相推动经过十字型通道，从垂直方向的通道注入油相，可将液滴进行分割（该过程可用PLC控制器控制，实现液滴的定量分割）。生成的液滴继续往复运动，实现液滴内菌体的恒化培养和适应性进化。

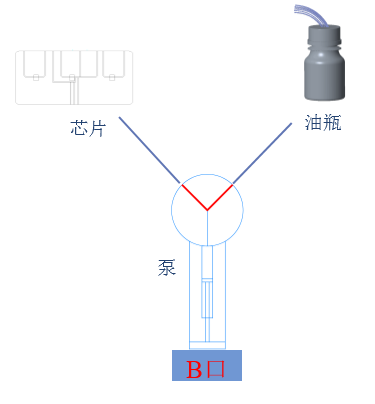


图2.液滴生成示意图

方法验证2：生长检测

验证过程：检测区域两端分别接有光纤光谱仪的光源光纤与接收光纤。当液滴往复运动以经过检测区域时会吸收掉部分光纤光谱仪光源发出的光，剩余光进入检测光纤后根据标定的空白样品吸收光强度计算出该微滴的吸光度数值并实时反馈到电脑的软件上，根据波长600nm处微滴的吸光度可折算出微滴内菌体的浓度。光纤光谱仪采集数据的频率可调，可选取同一平台3-5个误差为±0.001的数据点并取平均值作为该水相液滴的吸光度数值。



图3.生长检测示意图

方法验证3：生长曲线测定

验证材料：大肠杆菌E.coli MG1655，E.coli S17-GFP，变异的大肠杆菌，谷氨酸棒杆菌13032，LB培养基，油相、微生物连续培养芯片、液压瓶

方法验证3.1：大肠杆菌E.coli MG1655摇瓶、孔板和高通量微生物液滴培养系统里的生长曲线对比，对比图如图4所示。

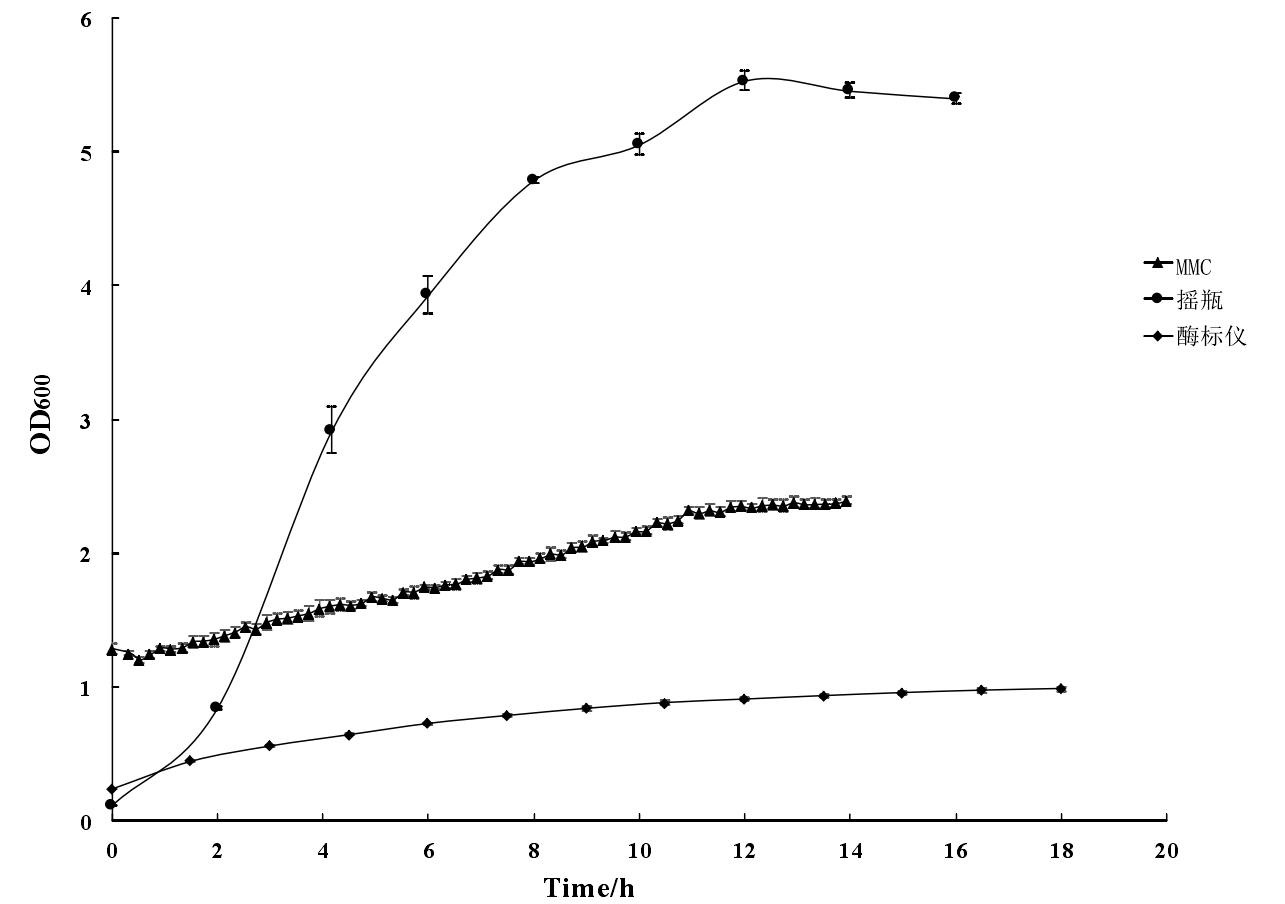


图4. 大肠杆菌E.coli MG1655摇瓶、孔板和MMC里的生长曲线对比图

方法验证3.2：大肠杆菌E.coli S17-GFP摇瓶、孔板和高通量微生物液滴培养系统里的生长曲线对比，对比图如图5所示。

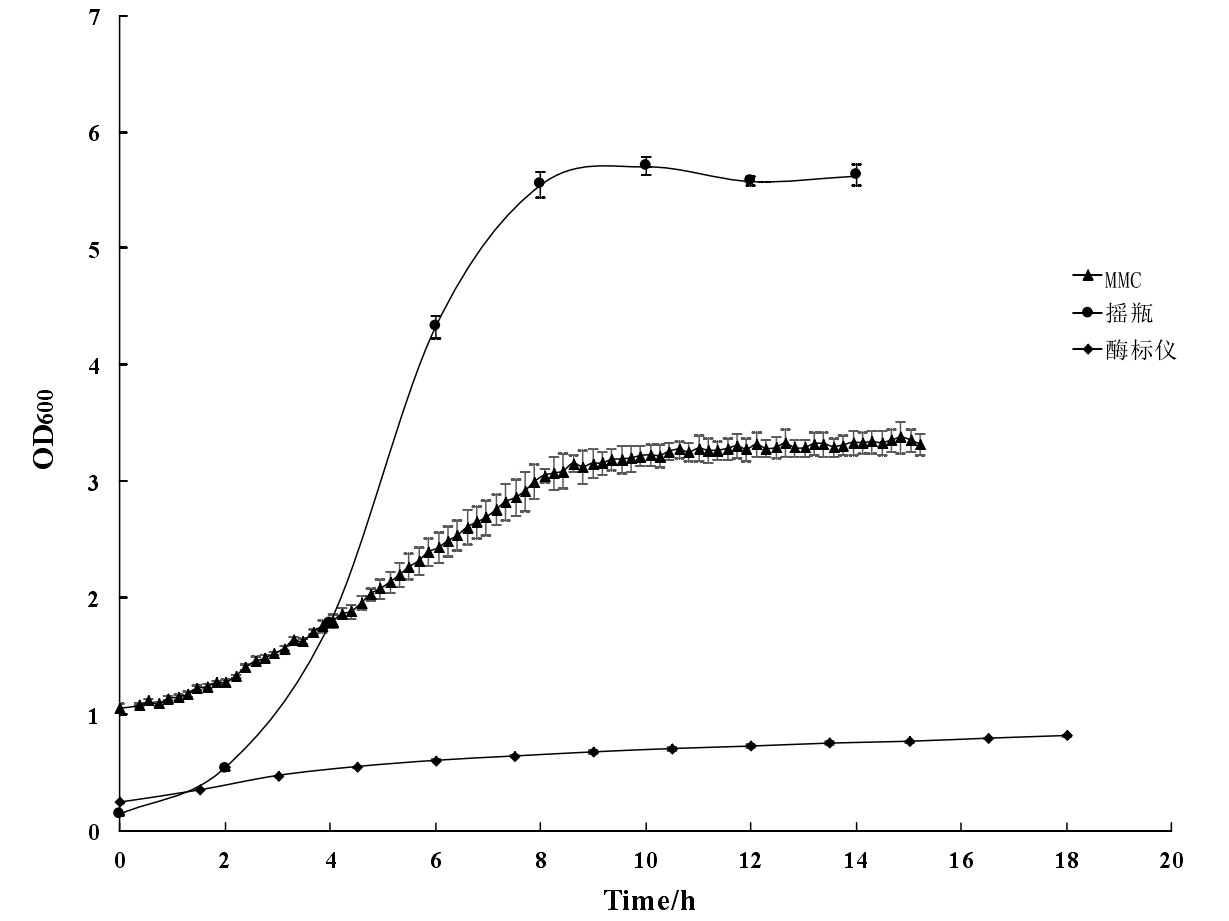


图5. 大肠杆菌E.coli S17-GFP摇瓶、孔板和高通量微生物液滴培养系统里的生长曲线对比图

方法验证3.3：谷氨酸棒杆菌13032摇瓶、孔板和高通量微生物液滴培养系统里的生长曲线对比，对比图如图6所示。

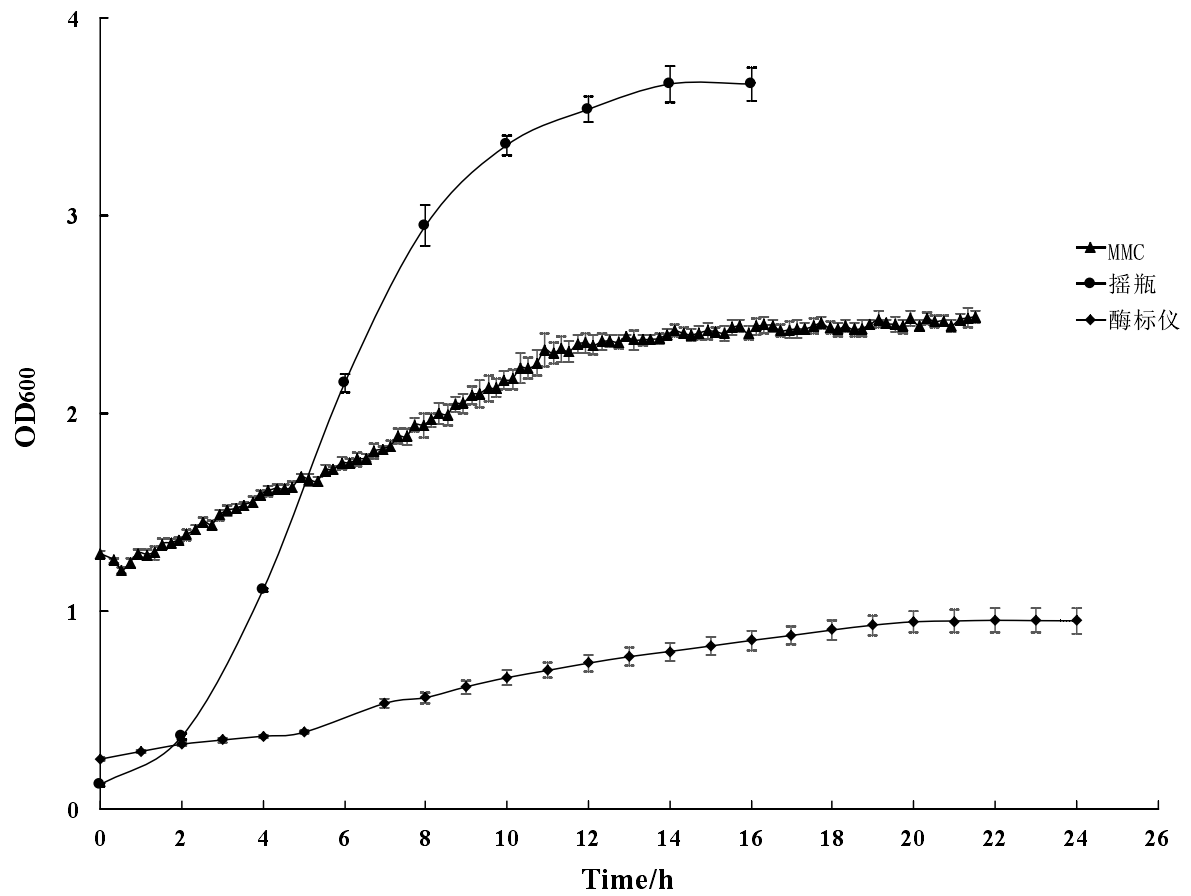


图6. 谷氨酸棒杆菌13032摇瓶、孔板和高通量微生物液滴培养系统里的生长曲线对比图

验证结果：高通量微生物液滴培养系统培养菌体，生长状况在摇瓶和酶标仪之间，能够有效进行细菌培养。同时，经过实验得出本仪器适用于单细胞类微生物：细菌、酵母等

方法验证3.4：出发菌株在无辛酸 10mM辛酸培养基中的生长曲线

验证材料：大肠杆菌E.coli MG1655，LB培养基，M9培养基，辛酸，卡那霉素， 油相，微生物连续培养芯片，液压瓶

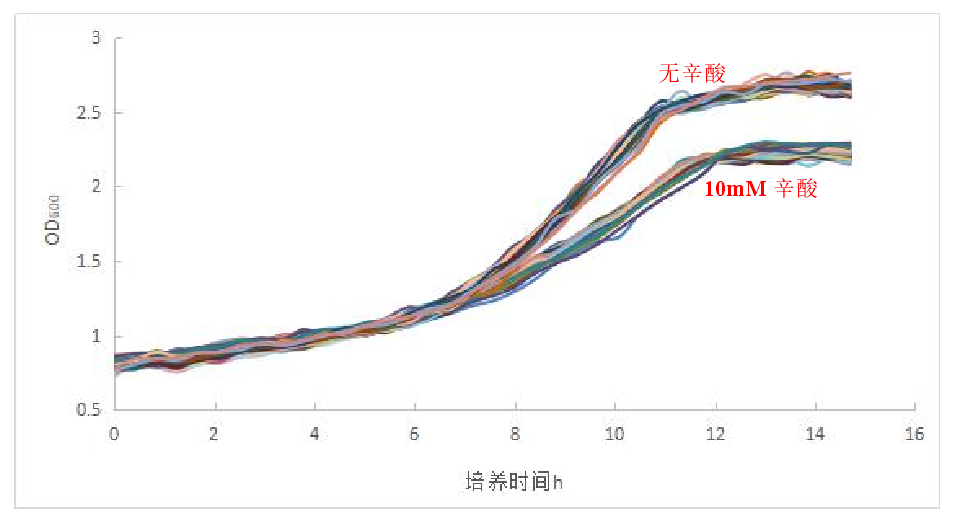


图 7. 出发菌株在无辛酸 10mM辛酸培养基中的生长曲线

验证结果：辛酸微溶于水、易溶于有机溶剂，对比图7中两条曲线的生长速率及达到的最大OD值，可以得出辛酸并未被体系中的油完全萃取，在高通量微生物液滴培养系统培养过程中对菌株起到了抑制作用。

方法验证3.5：发菌株在10g/L山梨糖浓度培养基中的生长曲线

验证材料：马红球菌，LB培养基，底物4-硝基乙酰苯胺，油相，微生物连续培养芯片，液压瓶

验证过程：诱变及未诱变马红球菌在高通量微生物液滴培养系统平台培养16h左右的生长曲线如图8所示：通过分析发现诱变菌株77号、78号、79号、80号、108、109 号液滴较其它诱变及未诱变菌株液滴的产CDA酶量高，OD值均达到1以上，因此将其进行提取。液滴提取后，余下液滴又在平台上继续培养，分析OD数据发现，其中72号液滴OD值最高可达到3.8左右。提取该液滴，通过活化，平板画线，镜检，发现活化菌株为马红球菌，保菌。

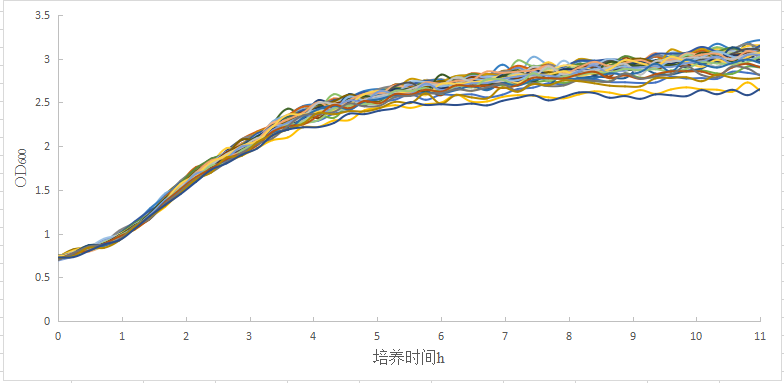


图8.出发菌株在10g/L山梨糖浓度培养基中的生长曲线

方法验证4：适应性进化

方法验证4.1：大肠杆菌E.coli MG1655在甲醇胁迫下的适应性进化

验证材料：大肠杆菌E.coli MG1655，LB培养基，甲醇， 油相、微生物连续培养芯片、液压瓶



图9.大肠杆菌E.coli MG1655在甲醇胁迫下传代图

方法验证4.2：耐高浓度辛酸大肠杆菌筛选实验

验证材料：大肠杆菌E.coli MG1655，LB培养基，M9培养基，辛酸，卡那霉素， 油相，微生物连续培养芯片，液压瓶

验证过程：实验过程中电脑故障自动重启了一次，之后手动继续进行培养，所以结果分为两个图；传代时间设定为9h；第一轮进化由5mM-10mM，设定5、6、7、8、9、10mM这6个梯度，每个梯度传代至少5次；图10中红线位置为该辛酸浓度下第一次传代时达到的OD值；5mM-9mM每个浓度各传了5代，10mM传了14代。

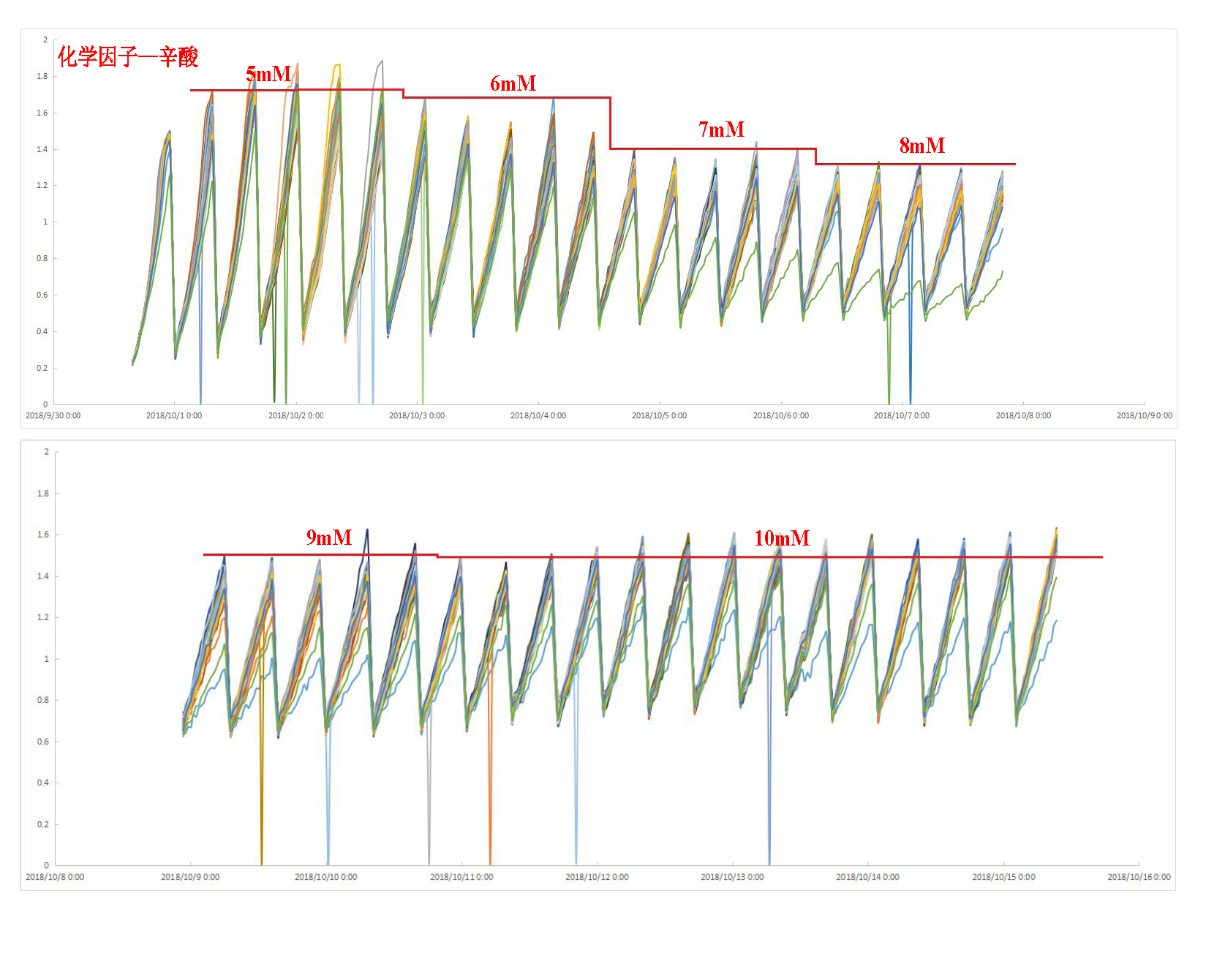


图10.第一轮适应性进化实验曲线图

验证结果：根据第一轮进化曲线图（图10），选择了生长状况较优的 9、15、17、23这四个液滴进行提取和保存；在 50mL离心管体系中进行培养（4mL培养基，10mM辛酸），23 号菌株（编号 1-23）生长状况优于其他 3 株（培养过夜后 OD 增长量较大），但与出发菌株相比并不明显；对菌株 1-23 和出发菌株进行生长曲线测定（10mM辛酸培养基），对比结果见图 11，菌株 1-23 生长速率较出发菌株有所提高。

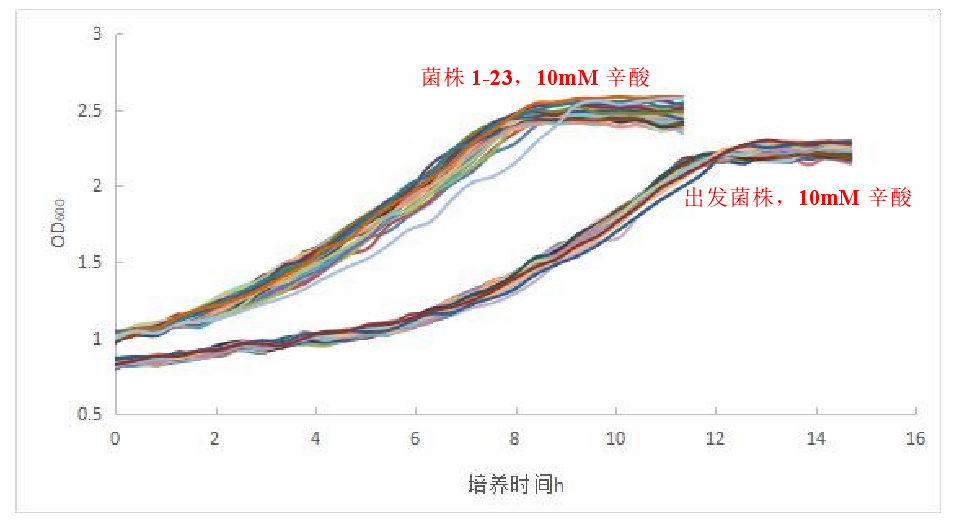


图11. 菌株在 10mM辛酸培养基中的生长曲线

验证过程：传代时间设定为 9h；由于第一轮进行效果不明显，第二轮进化提高了适应因子浓度。由10mM-20mM，设定 12、16、18、21mM这 4 个梯度，同时增加了每个梯度的传代次数（至少 10 次），以期菌株能更好的适应高浓度辛酸。

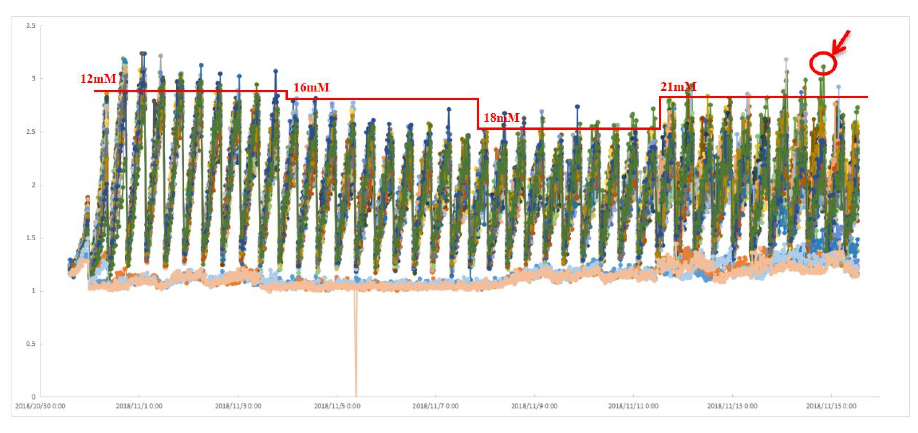


图12.第二轮适应性进化实验曲线图

验证结果：根据第二轮进化曲线图（图12），24 号液滴（编号 2-24，红色箭头指向）在多次传代中生长状况都优于其他液滴，进行提取后划线保存；对菌株 2-24 和出发菌株进行生长曲线测定（20mM辛酸培养基），对比结果见图13，菌株 2-24 生长速度明显优于出发菌株，即辛酸耐受性有一定的提高；在 50mL离心管体系中进行培养（4mL培养基，20mM辛酸），菌株 2-24生长状况优于出发菌株（培养过夜后OD增长量较大），将此菌株保存。后续对菌株 2-24 发酵后的产物进行了检测，总脂肪酸产量相对于出发菌株提高了 15%-20%，OD600 提高了约 25%。

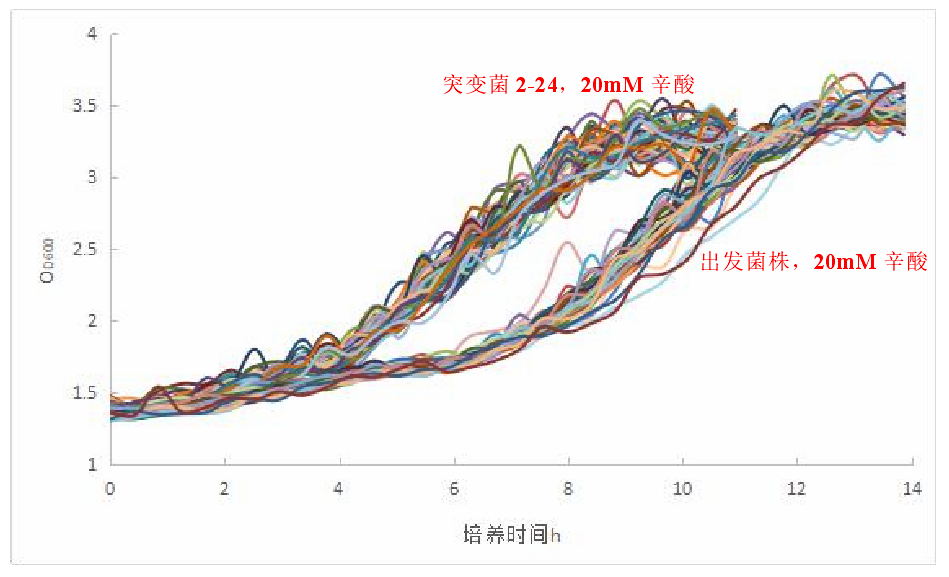
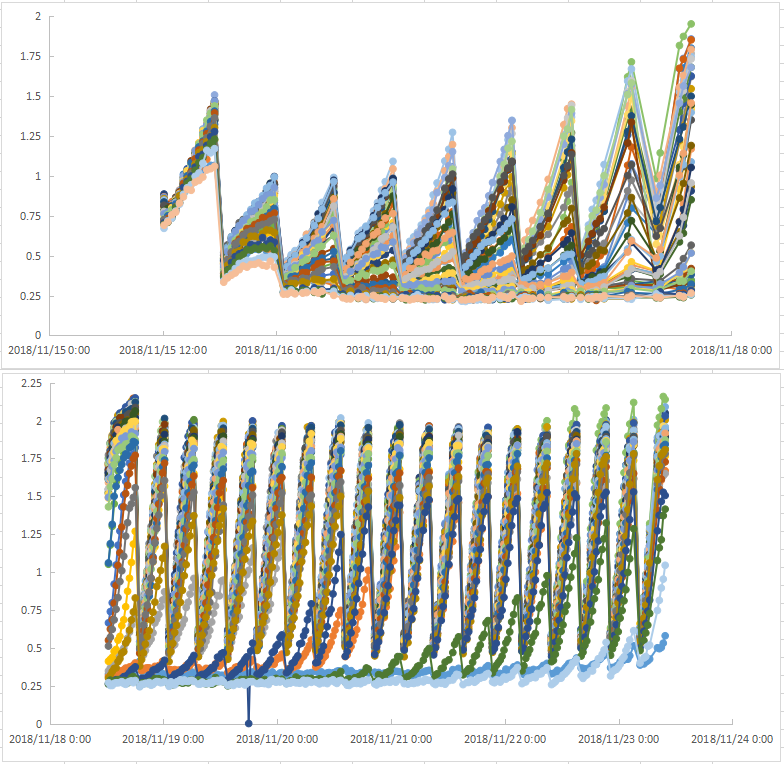


图13.菌株在 20mM辛酸培养基中的生长曲线

方法验证5：筛选耐高浓度山梨糖的大肠杆菌突变菌株

验证材料：大肠杆菌，LB培养基，Amp， 油相，微生物连续培养芯片，液压瓶

验证过程：实验过程中软件故障，之后手动调整参数后继续进行培养，所以结果分为两个图；红线位置为该山梨糖浓度下第一次传代时达到的 OD 值；传代时间设定为6h；图14浓度设定为10.00、13.33、16.67、20.00g/L这4个梯度，每个梯度传代2次；图14浓度设定为10.00、20.00、30.00g/L这3个梯度，每个梯度传代至少5次。



**30.00g/L**

**10.00g/L**

**20.00g/L**

**10.00g/L**

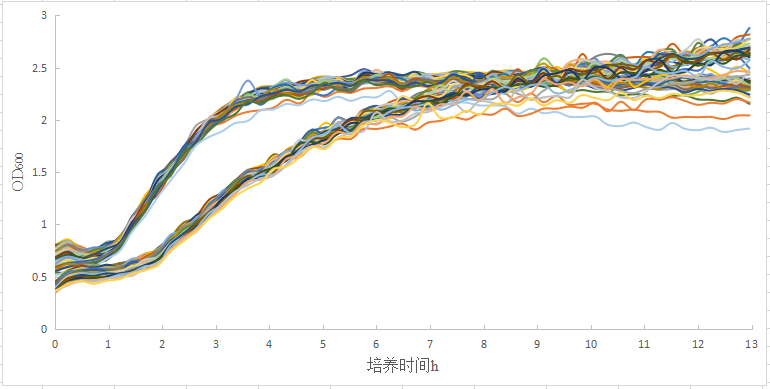
**13.33g/L**

**16.67g/L**

**20.00g/L**

图14.耐高浓度山梨糖的大肠杆菌第一轮进化曲线图

验证结果：根据第一轮进化曲线图（图14），将全部液滴进行提取和保存，对1-18号菌（图中红色圆圈标记）进行划线传代，准备进行验证及第二轮进化；对菌株1-18和出发菌株进行生长曲线测定（30g/L山梨糖培养基），对比结果见图15，菌株1-18生长速度明显优于原始菌株，即菌株对山梨糖耐受性有一定的提高；



**出发菌株**

**菌株1-18**

图15.菌株1-18和出发菌株在30g/L山梨糖培养基中的生长曲线

在50mL离心管体系中培养6h（4mL培养基，30g/L山梨糖），菌株1-18生长状况优于出发菌株，具体数据见表1。

表1 50mL离心管体系培养结果

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 菌号 | OD600（稀释5倍） | |
| 单菌落接种 | 液体转接液体（接种量10%） |
| 出发菌株 | 0.466 | 0.468 |
| 菌株1-18 | 0.745 | 0.814 |

**七、与有关的现行法律、法规和强制性国家标准的关系**

本标准符合国家现行法律、法规、规章和强制性国家标准的要求。本标准的实施不涉及对现行标准的废止情况。

**八、标准属性的建议**

本标准为推荐性国家标准。

**九、贯彻国家标准的要求和措施建议**

标准发布实施后，建议由标准编制单位组织有关生产、检验、设计等单位进行宣传贯彻。

**十、其他应予说明的事项**

无其他事项说明。