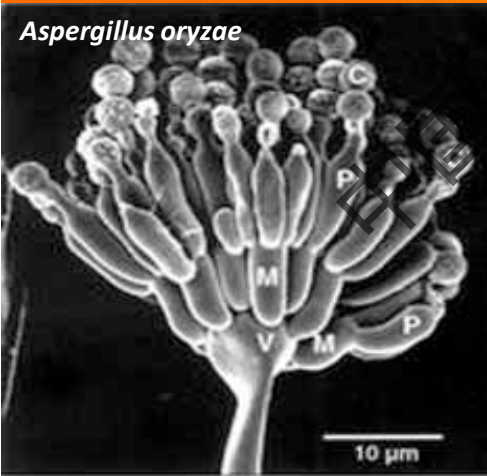


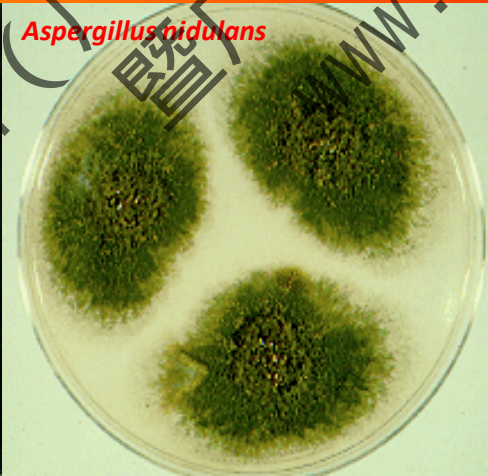
华南理工大学  
South China University of Technology

# 高产菌株的育种及高通量筛选技术

华南理工大学生物科学与工程学院  
潘力 教授



*Aspergillus oryzae*



*Aspergillus nidulans*



*Aspergillus niger*

*Aspergillus Niger* (a common household mold)



*Aspergillus fumigatus*

# 工业菌种的育种意义

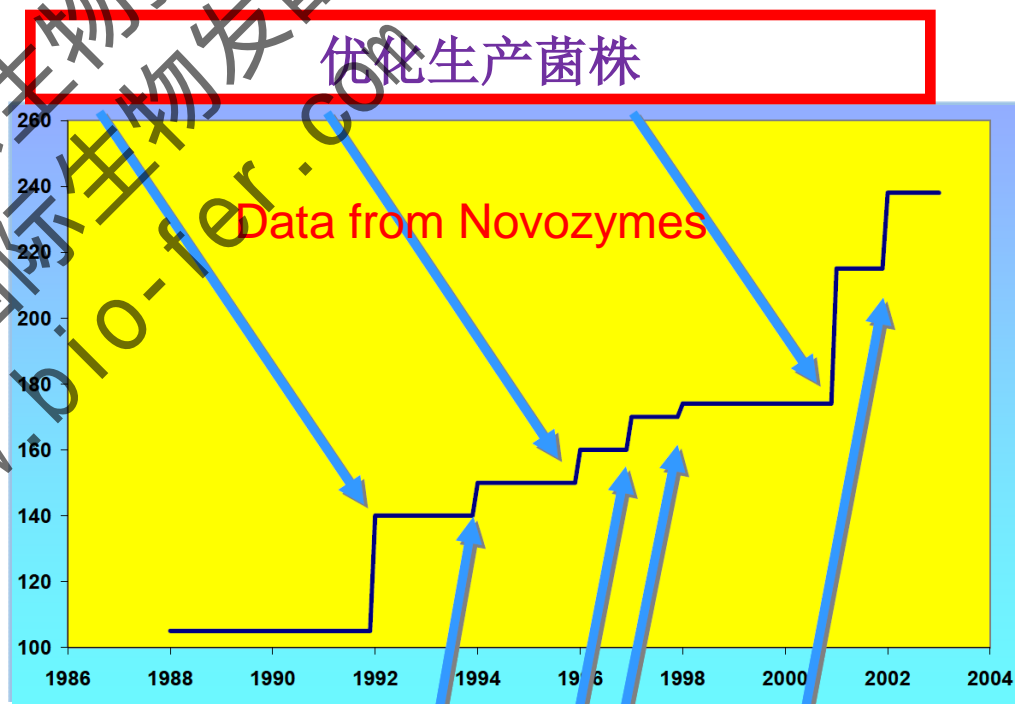
## 1、菌种发酵水平是企业产品市场竞争力的体现之一

- 菌种是发酵技术的源头
- 菌种是发酵技术的核心之核心
- 菌种提高不增加设备材料投入

- 选择优良的宿主菌
- 构建表达载体
- 宿主菌的转化
- 转化子的分析
- 优选转化菌的发酵控制技术

菌株  
生产过程

联合优化：丝状真菌宿主菌中的蛋白生产



年

优化生产工艺过程

# 工业菌种的育种意义

## 2、育种工作中两大任务：突变与筛选

变异菌种库	筛选目标株
自然选育	筛选模型
人工诱变	
推理选育	
杂交育种	
基因工程	高通量筛选量
代谢工程	
组学技术	
系统生物学	
合成生物学	

突变是前提  
筛选是关键

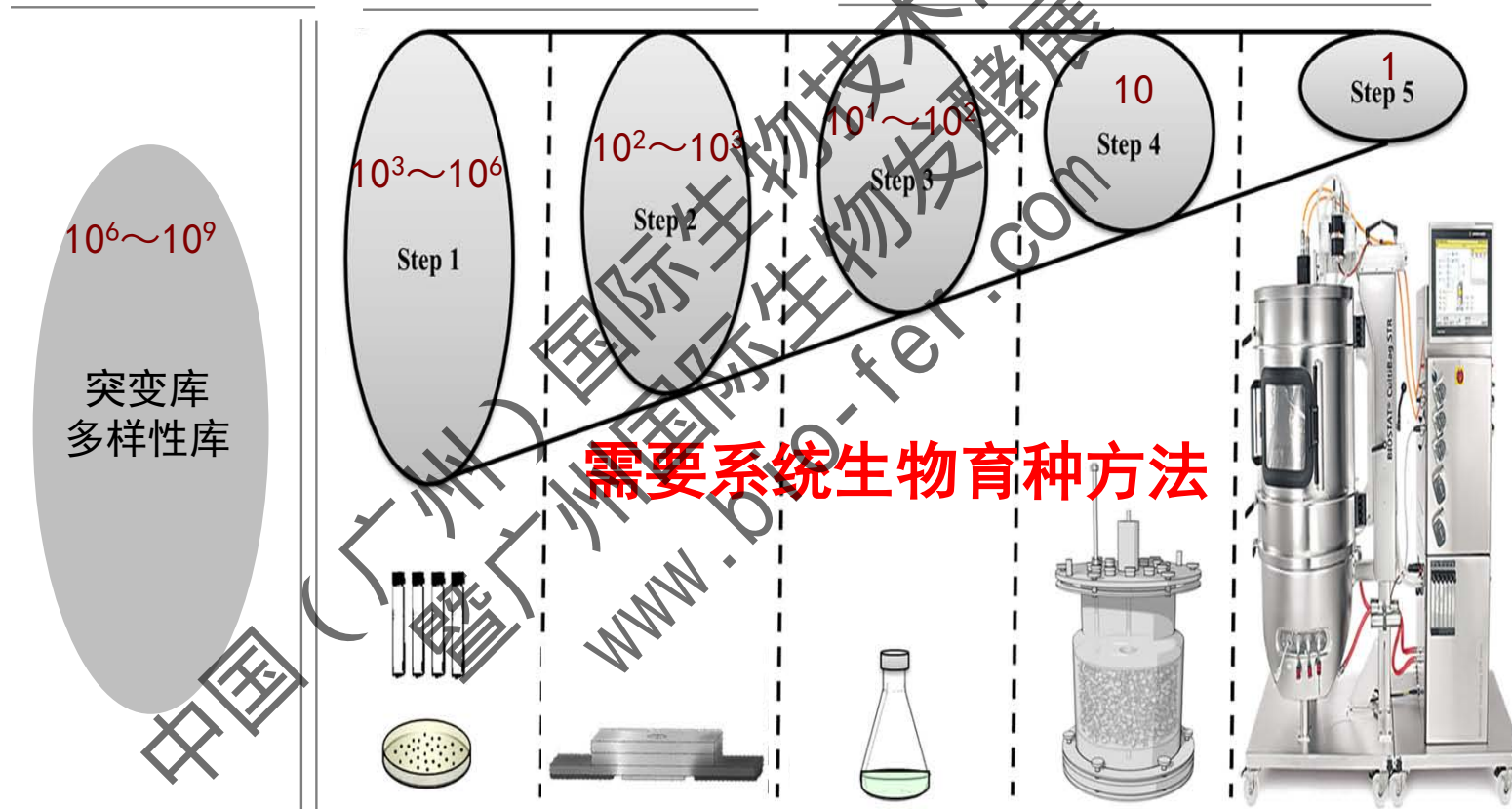
# 工业菌株的育种意义

工业微生物育种需要漫长复杂的过程：**突变与筛选**

建库

筛选

评价



高效率

高通量

设备化

知识产权

# 工业菌种的育种意义

## 3、菌种选育目标

- **提高产量：**生产效率和生产效益是首位的目标。（1）增加基因剂量；（2）破坏基因调控（如分解产物脱抑制，代谢产物阻遏）；（3）改变通透性促进产物排出。
- **促进发酵生产过程：**（1）提高产物的纯度：减少副产物；提高有效组分；减少色素等杂质。（2）改变菌种性状或改善发酵过程：改变和扩大菌种所利用的原料结构；改善菌种生长速度；改善对氧的摄取条件，降低需氧量及能耗；耐不良环境，抗噬菌体的侵染，耐高温、耐酸碱、耐自身所积累的代谢产物。（3）菌种的遗传性状：特别是生产性状稳定。
- **改变生物合成途径：**微生物基因型的变化导致新代谢产物的合成。

# 以突变和筛选为中心的传统育种技术

(1) 自发突变；(2) 物理诱变剂：辐射（短波长的UV，200-300，优化254nm；离子辐射，如X-射线， $\gamma$ -射线和 $\beta$ -射线）；(3) 化学诱变剂（影响非复制DNA突变剂如亚硝酸 $\text{HNO}_2$ ，羟基铵 $\text{NH}_2\text{OH}$ ，烷基化试剂；碱基类似物或移码突变剂，能被吸收或进入复制中的DNA）；

诱变剂分类	诱变剂	突变类型	突变对DNA的影响
物理诱变	X-射线， $\gamma$ -射线	删除，结构变异	DNA单链或双链断裂
	紫外UV	颠换，删除，移码，转换 GC $\rightarrow$ AT	DNA中嘧啶二聚化和交联
化学诱变	5-溴尿嘧啶	转换GC $\rightarrow$ AT，AT $\rightarrow$ GC	碱基配对错误
	羟胺	转换GC $\rightarrow$ AT	胞嘧啶C脱氨
	亚硝酸	双向转换，删除， GC $\rightarrow$ AT，AT $\rightarrow$ GC	A, C, G脱氨
	亚硝基胍NTG	转换GC $\rightarrow$ AT	甲基化，pH高时C和A烷基化
	硫酸二甲胺	转换GC $\rightarrow$ AT	C和A烷基化

# 以突变和筛选为中心的传统育种技术

## 经典的传统育种技术

### 紫外诱变 (UV)

- 短波长：200–300nm（优化：254nm）；
- 产物：相邻嘌呤形成二聚体（T-T, T-C和G-G）或互补链上嘌呤二聚体（导致交联）；
- 突变：主要诱导的GC→AT转换、颠倒数、移码和删除；
- 突变机制：错误倾向SOS修复机制；
- 阻止光修复和切除修复机制：操作在 $\geq 600\text{nm}$ 下进行/用咖啡因或类似物抑制修复；

### 烷基化试剂

- 甲基硫酸乙酯（EMS），甲基硫酸甲酯（MMS），硫酸二乙酯（DES），双环氧丁烷（DEB），亚硝基胍（NTG）；N-甲基-N-亚硝基脒和芥子气；
- **亚硝基胍 (NTG)**：90%突变是GC→AT转换；在酸性溶液中形成亚硝酸，在碱性条件下形成重氮甲烷（强烈的甲基化试剂）；突变的第二效应是引入错误倾向SOS修复机制。

# 传统育种技术经典例子

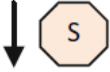
U 紫外诱变

S 自发突变

X X-射线诱变

N NTG诱变

*Penicillium chrysogenum* NRRL-1951 (60mg/L)



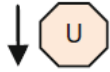
*Penicillium chrysogenum* NRRL-1951, B-25



X-1612 (100mg/l)



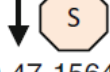
WISQ-176 (300mg/l)



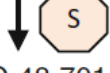
WISQ-BD13



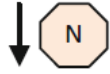
WISQ-47-638



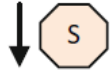
WISQ-47-1564



WISQ-48-701



WISQ-49-133



E.1

WISQ-51-20

Carnegie Institute of Washington & University of Minnesota

University of Wisconsin

*Penicillium chrysogenum* NRRL-1951



WISQ-51-20

.1



.3



.4



.6



.8



.9



.10



.12



.13



.14



.15



*Penicillium chrysogenum* E.15.1

21轮突变筛选

*P. chrysogenum* E15.1

摇瓶: 7g/L penicillin

发酵罐: 20g/L penicillin

Eli Lilly Industries

- Ultraviolet Rays
- Spontaneous mutation
- X-Rays
- Nitrogen Mustard



# 以突变和筛选为中心的传统育种技术

## 新型的诱变技术

### ➤ 离子注入诱变：

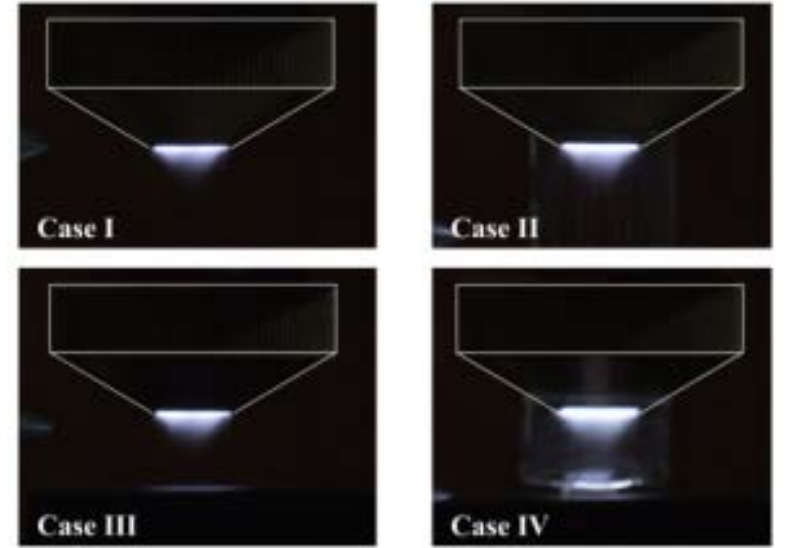
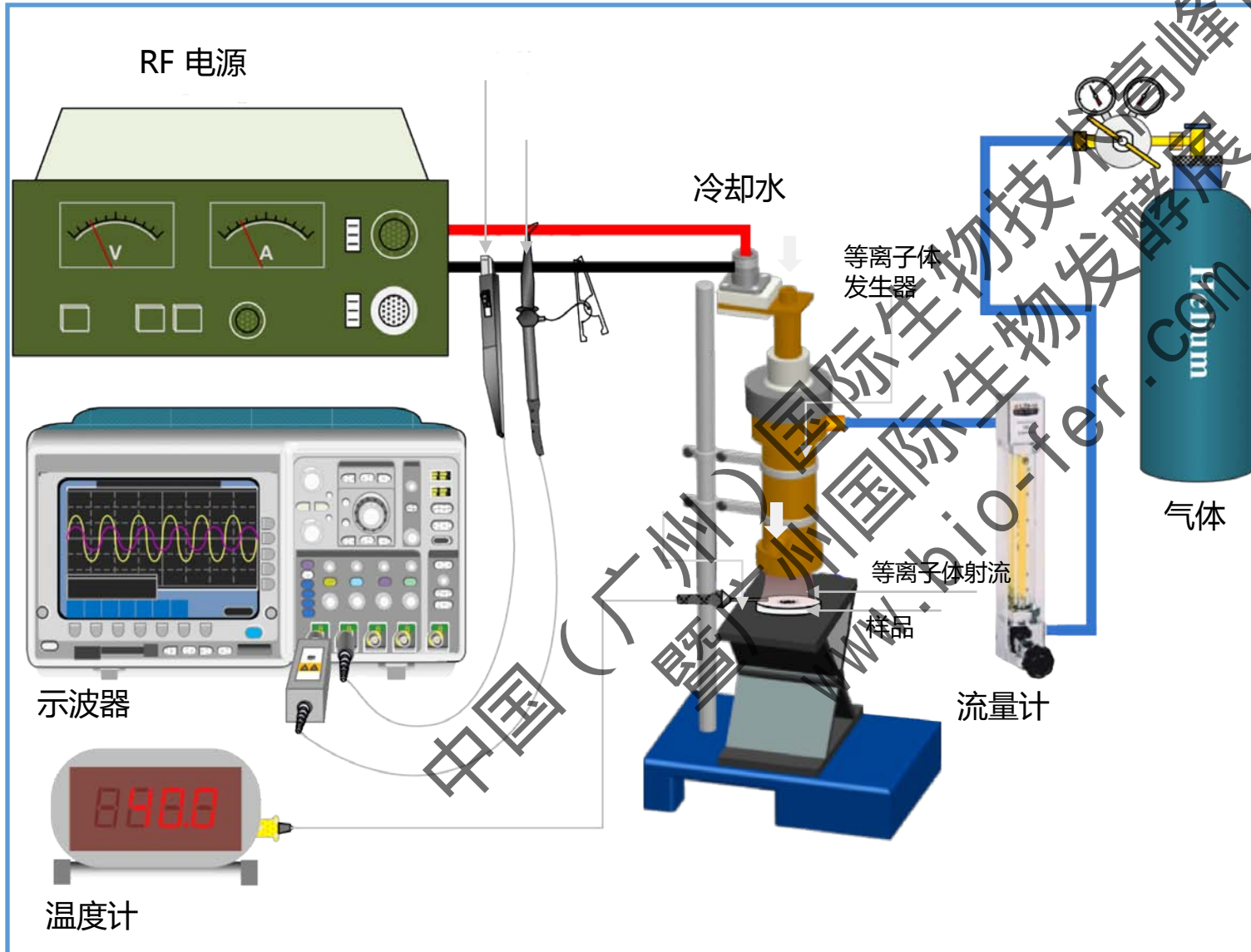
- 离子注入时，生物分子吸收能量，并且引起复杂的物理和化学上的变化，这些变化的中间体是各类活性自由基。这些自由基，可以引起其它正常生物分子的损伤，可使细胞中的染色体突变，DNA 链断裂，也可使质粒DNA 造成断裂。
- 离子注入法进行微生物诱变育种，一般实验室条件难以达到，目前应用相对较少。

### ➤ 常压室温等离子体 (ARTP) 诱变：

- 指能够在大气压下产生温度在25-40 °C之间的、具有高活性粒子（包括处于激发态的氢原子、氧原子、氮原子、OH自由基等）浓度的等离子体射流，能够使微生物细胞壁/膜的结构及通透性改变，并引起基因损伤，菌株出现遗传物质损伤后，微生物启动SOS修复机制。
- **ARTP技术作为一种新型的物理方法，应用于微生物突变育种，成本低、操作方便。**

# 新型安全高效突变源：常压室温等离子体（ARTP）

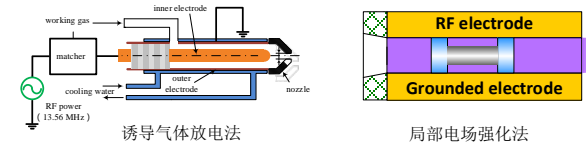
## 清华ARTP生物育种技术与装备创新



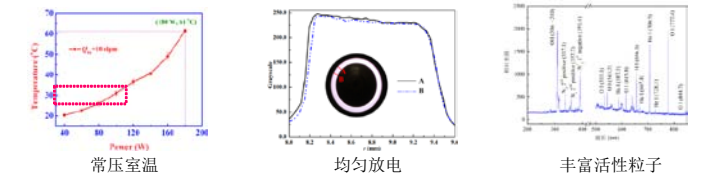
### 1) 发明等离子体与微生物的非直接作用模式



### 2) 多种气源作工作气体产生低温均匀等离子体射流

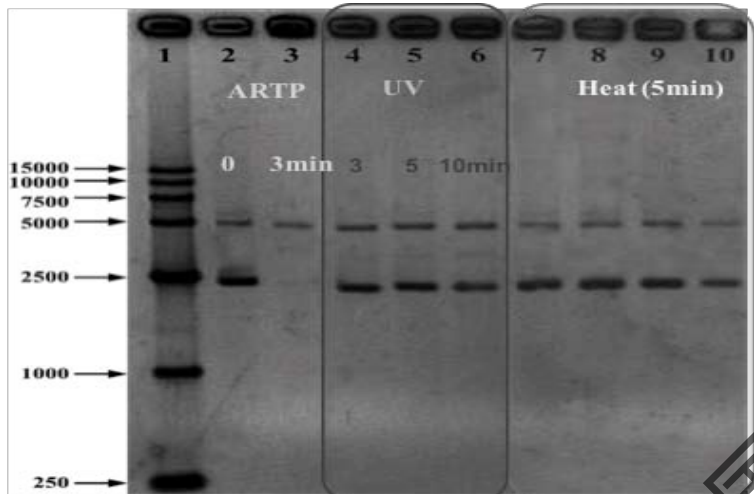


### 3) 局部环境控制调变等离子体质量适应生物材料处理要求



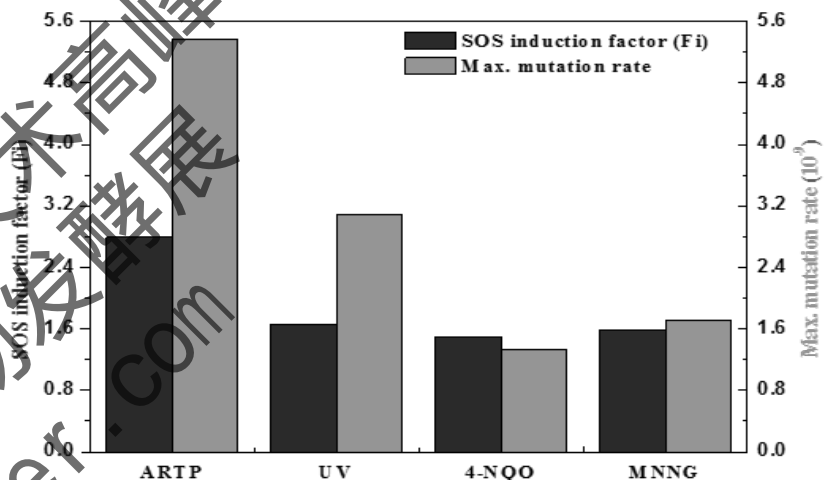
# ARTP生物学效应机制

活性粒子导致遗传物质损伤

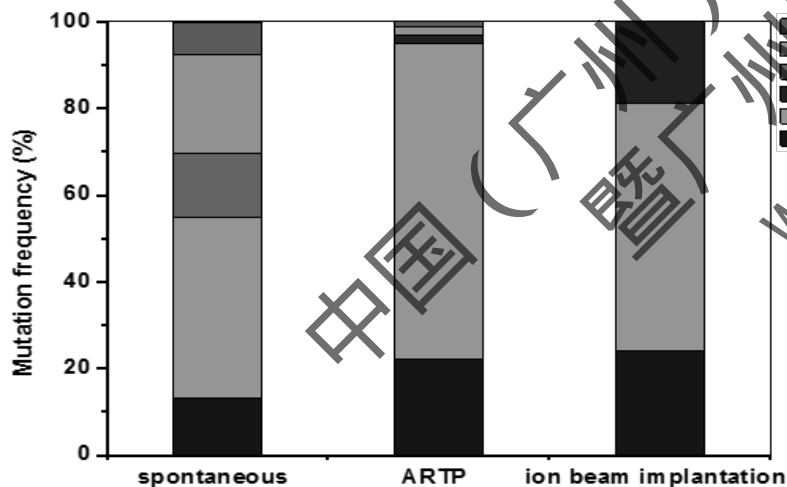


Guo Li et al., APL (2008)

具有更高的遗传物质损伤和突变概率



Xue Zhang et al., AMB (2015)



具有独特的突变偏好性

不同螺旋藻株多糖含量 (w/w,%) 稳定性 (每代培养: 2 周)

螺旋藻株	传代次数 11	传代次数 15	传代次数 20
野生株 (对照)	17.66 ± 2.2	18.35 ± 1.2	18.66 ± 1.1
3-A10	26.54 ± 2.1	24.85 ± 3.2	26.14 ± 2.5
3-B2	33.31 ± 2.7	32.71 ± 2.4	33.18 ± 1.4
4-B3	13.44 ± 2.0	14.12 ± 2.6	13.14 ± 3.1

PLoS ONE, 8(10): e77046, 2013

具有良好的遗传稳定性

# ARTP生物诱变广泛用于种质/菌种育种

05 305 605 905 1205 1505

植物界  
Plantae

真菌界  
Fungi

動物界  
Animalia

## ARTP 生物育种特点:

- 安全快速创制多样突变库
- 与高通量筛选/进化技术结合获取高效菌种
- 全局突变，能够激活沉默基因及代谢途径
- 能够应用于发掘生物暗物质及新生物功能

## ARTP 育种成效:

- 提高产量、活性或效价
- 提高耐受性
- 提高生长速率
- 营养缺陷型恢复
- 提高转化及代谢能力等。
- 广泛用于生物产业

> 100 kinds of microbes and animals & plants

藻類  
Algae

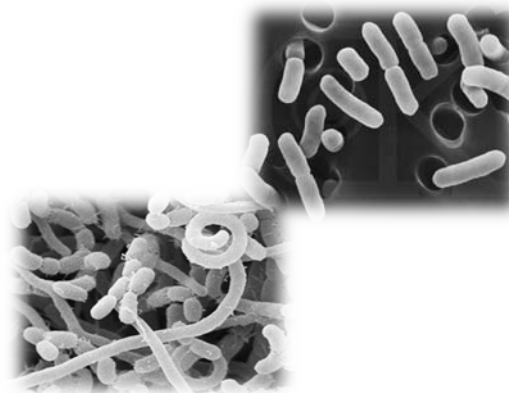
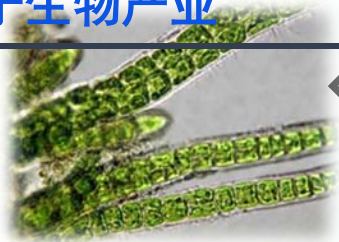
原生動物  
Protozoa

原生動物界  
Protista

細菌  
Bacteria

原核生物界  
Monera

(a)

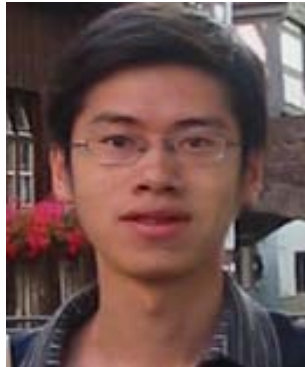


# ARTP 生物育种装备研制及产业化应用推进



邢新会

- 育种技术与装备
- 健康生物产品工程
- 微生物组工程



张冲

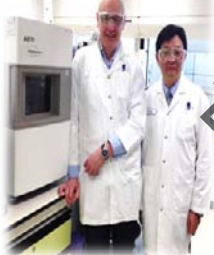
- 代谢工程
- 高通量技术与装备
- 合成与系统生物学



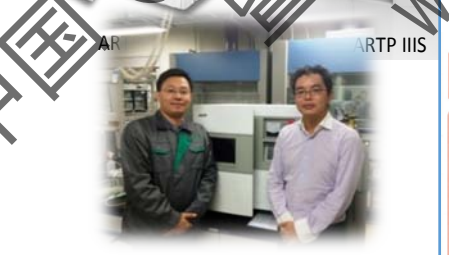
卢元

- 无细胞合成生物技术
- 生物大分子医药工程
- 生物检测技术

- 成功研制出国际首套ARTP生物育种装备
- 操作简便、快速，安全性高（**辐射水平低于手机**）；突变效率高，突变库容大
- 成功应用于**100余种**各类微生物和动植物的诱变育种
- 服务大专院校、科研机构和重要企业70余家。
- 出口日本、新加坡等
- 获得第45届日内瓦国际发明展金奖，通过轻工联合会技术鉴定，国际领先



ICES, Singapore



Kobe U, Japan



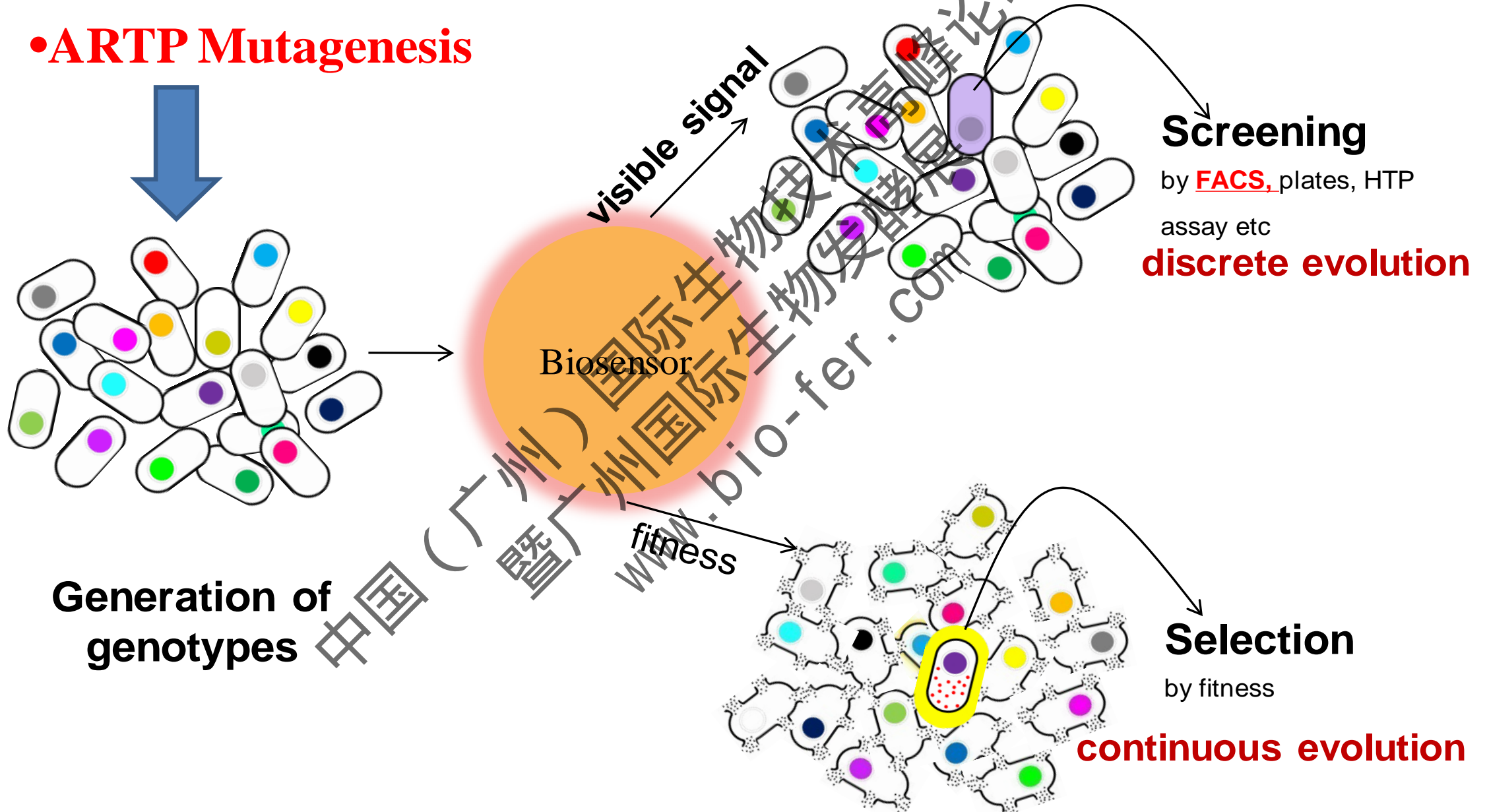
动植物ARTP诱变仪

获得第45届日内瓦国际发明展金奖暨泰国国家科研基金会优秀发明奖



# 基于ARTP突变及生物传感的高通量进化工程方法

## •ARTP Mutagenesis



# 高通量微生物进化仪总体结构

国家自然科学基金重大仪器专项

## 微液滴适应性进化MMC仪器系统

- 200个微滴/芯片
- 在线检测功能 (OD)
- 好氧/厌氧连续稳定培养
- 恒温：室温-70°C
- 自动化：定时定量更换培养基
- 智能化：根据生长状态进行筛选

微液滴恒化  
培养子系统

微液滴荧光超高  
通量筛选子系统

高精度原位  
诱变子系统



# 获取优良菌种的有效途径：基因重组育种

- (1) 真菌中重组：有性和准性循环；
- (2) 细菌中重组：转化、转导和结合；
- (3) 原生质融合；
- (4) 基因组重排genome shuffling

## ➤ 微生物基因重组：杂交育种理论基础

杂交育种选用已知性状的供体菌和受体菌作为亲本，相比诱变育种更加定向，并可消除诱变育种产量上升缓慢的现象。缺点杂交育种方法较复杂，大多数工业微生物的世代史不清楚，利用转化、转导和接合培育的应用到生产实践的高产菌例子不多，不如诱变技术那样得到广泛应用。

## ➤ 微生物基因重组策略：原生质体融合技术

(1) 大幅提高亲本间的重组频率；(2) 扩大重组的亲本范围；(3) 原生质体融合时亲本整套染色体参与交换、遗传物质转移和重组性状较多，集中双亲优良性状机会更大。

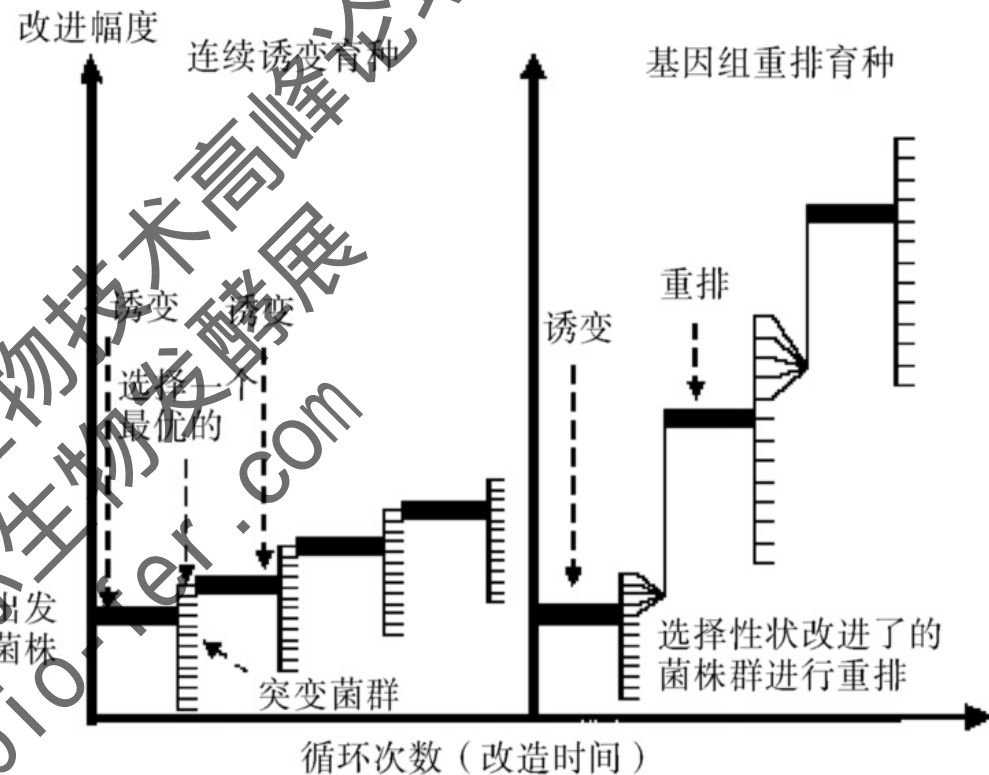
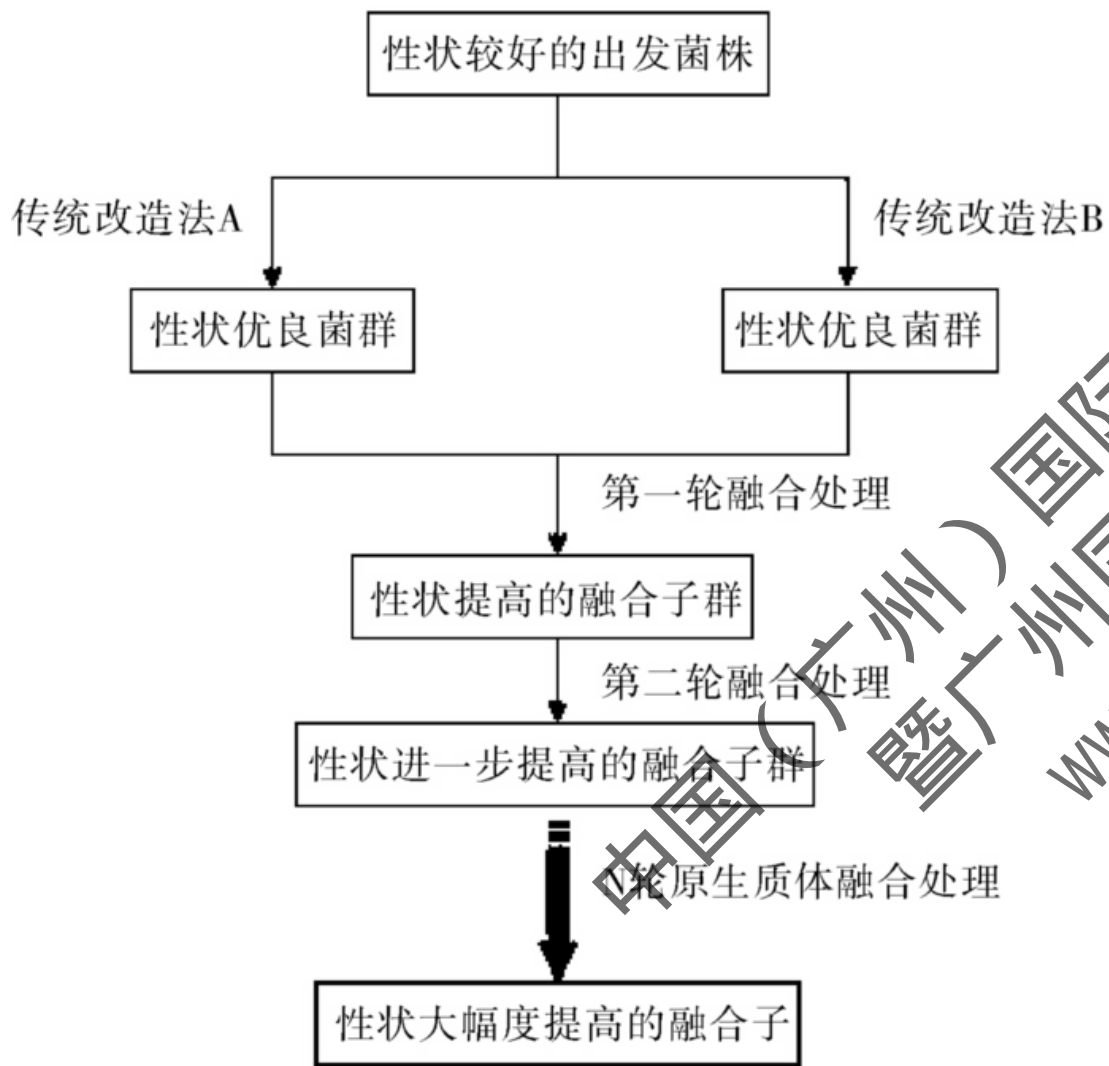
## ➤ 基因组改组 (Genome shuffling) 技术：传统菌种诱变技术与原生质体融合技术相结合

将传统育种得到的具有不同表型的菌株进行全基因重组，从而使得这些菌株的优良性状能集于一身。



# 基因组改组 (genome shuffling)

## 基因组重排的技术原理



以优良菌群作为出发菌株，提高育种效率。

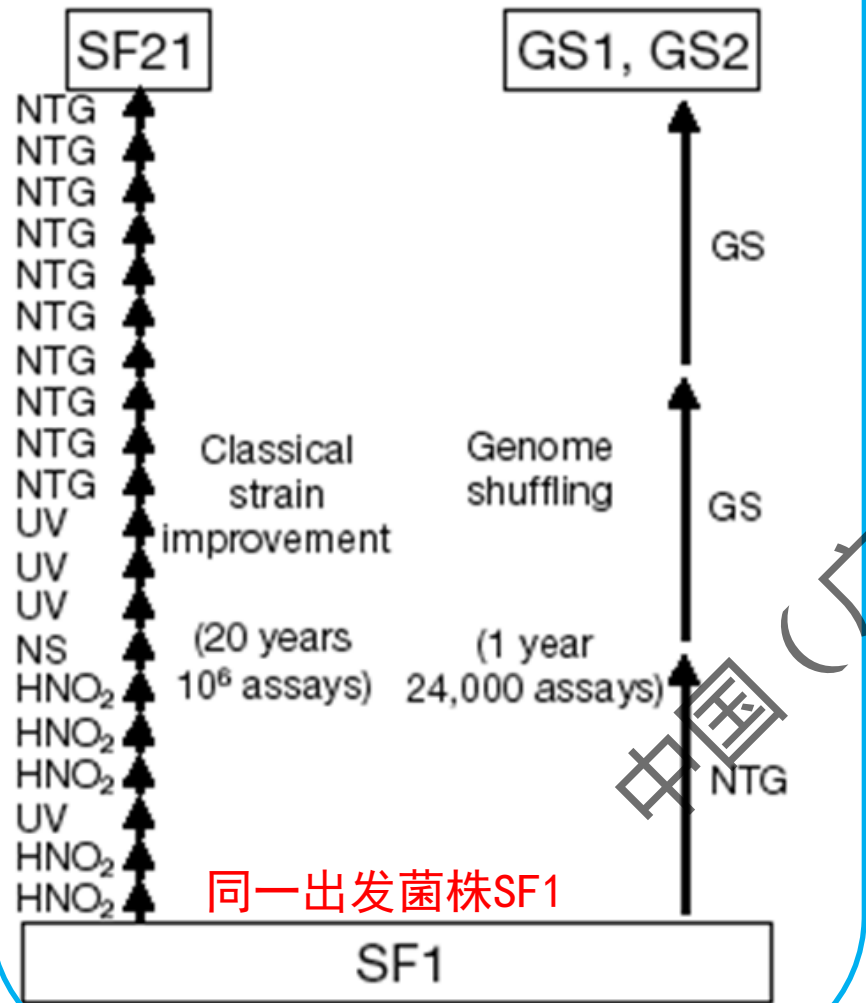
- 提高工业菌株的产量，降低生产成本；
- 改造微生物代谢途径，获得新性状或新产物；
- 优化微生物发酵特性，提高经济效益；

# 基因组重排 genome shuffling 育种的经典例子

泰乐菌素的生产菌弗氏链霉菌 (*Streptomyces fradiae*) 育种为例

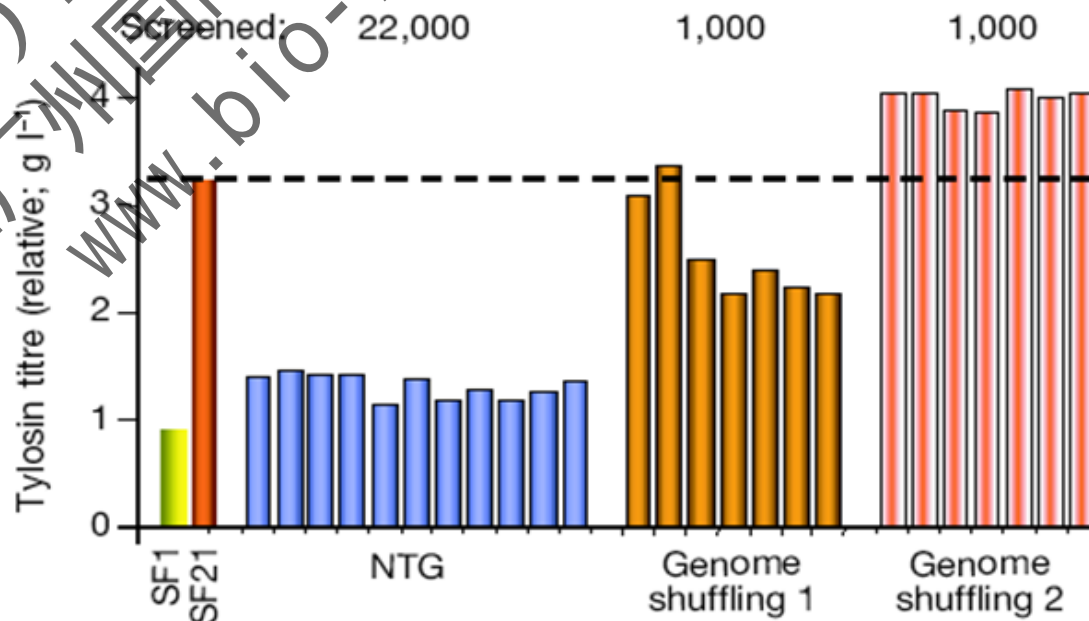
诱变育种  
20年 $10^6$ 株筛选

Genome shuffling  
1年 $2.4 \times 10^4$ 株筛选



利用Genome shuffling 经过两轮原生质体融合, 历经1年时间、24000株的筛选量, 所获得的重组株GS1、GS2 产泰乐菌素的能力, 高于传统诱变方法20年、 $10^6$ 株筛选所获得的菌株SF21 的产泰乐菌素的能力。

弗氏链霉菌菌株	泰乐菌素滴度 (rel. g l <sup>-1</sup> )
出发菌株SF1	1.0 ± 0.1
20年诱变菌株SF21	6.2 ± 2.4
第二代基因组重排菌株	8.1 ± 1.2
第一代基因组重排菌株	6.2 ± 1.2



Zhang, Y. X., et al. (2002). "Genome shuffling leads to rapid phenotypic improvement in bacteria." *Nature* **415**(6872): 644-646.

# 获取优良菌种的有效途径：基因工程分子育种

(代谢工程、系统生物学和合成生物学)

## 微生物基因工程育种基础

- 建立了工业菌种的遗传转化体系和分子改造工具完善；
- 基因组学和相关技术特别是二代测序技术、生物信息学和合成DNA技术的发展推动，几乎所有重要工业菌的基因组都已发表，提高代谢工程效率；
- 微生物分子遗传学、微生物分子生理学等微生物学各领域的研究逐渐深入分子水平；
- 系统生物学提供了从全局规模上深刻认识微生物生理和代谢特性的工具。

## 工业菌的代谢工程育种

- 建立在重组DNA技术基础之上的代谢工程技术，是一种在理解细胞代谢功能的基础上，有目的地设计和改造生物体中已有的代谢网络和表达调控网络，从而实现更高效的生物化学转化、能量转移及大分子装配过程的技术。
- 代谢工程技术能够有效地克服传统育种手段的突变非定向性和设计非理性的缺点，在改造微生物的代谢功能方面得到了广泛的应用。

# 工业菌的代谢工程育种

代谢工程三个基础观点

代谢能支持观点

细胞生长、维持以及产物形成需要生物能来支撑。

代谢网络观点

代谢网络由生化反应网络和跨运输步骤组成。没有绝对起点，也没有绝对终点。

细胞经济观点

野生型是竞争型的细胞经济，工程菌是导向型细胞经济，必须遵循细胞经济基本规律。

改变代谢流：增强催化反应酶的表达量和活性；有竞争途径存在，则阻断分支代谢途径。

扩展代谢途径：通过引入外源基因表达，使原来的途径向前或向后延伸，可利用新的原料来合成目标产物或阻断末端代谢产物。

构建新的代谢途径：引入外源基因（簇）来改造和修饰代谢网络，转换代谢途径或与其他代谢途径相连，使细胞具有合成新代谢物的能力。

代谢工程基本思路

代谢工程的研究重点已经逐渐从对单一基因或途径的扰动发展到对整个细胞代谢通路的调控，研究方法已经从传统对单个基因或单一途径的调控[10]转变为对整个细胞的基因表达和代谢网络进行全局调控。

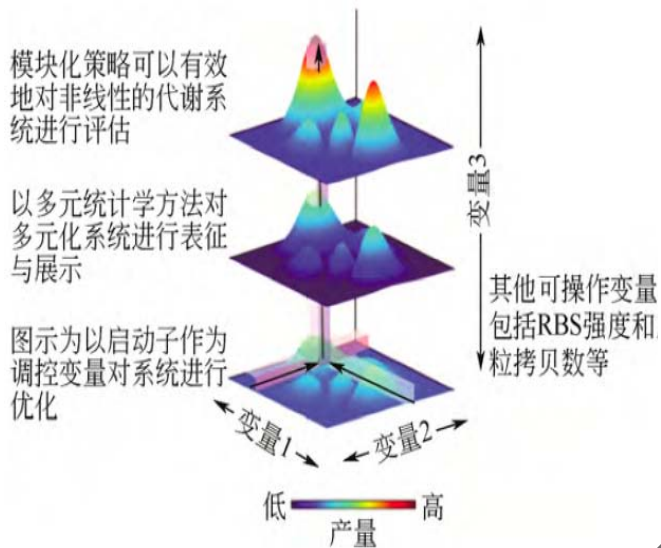
传统理性代谢工程方法：解调关键酶、基因敲除、过表达限速步骤基因等方法来解决代谢途径中的瓶颈。

现代代谢工程方法：模块化的代谢网络调控策略——多元模块工程 (multivariate modular metabolic engineering)

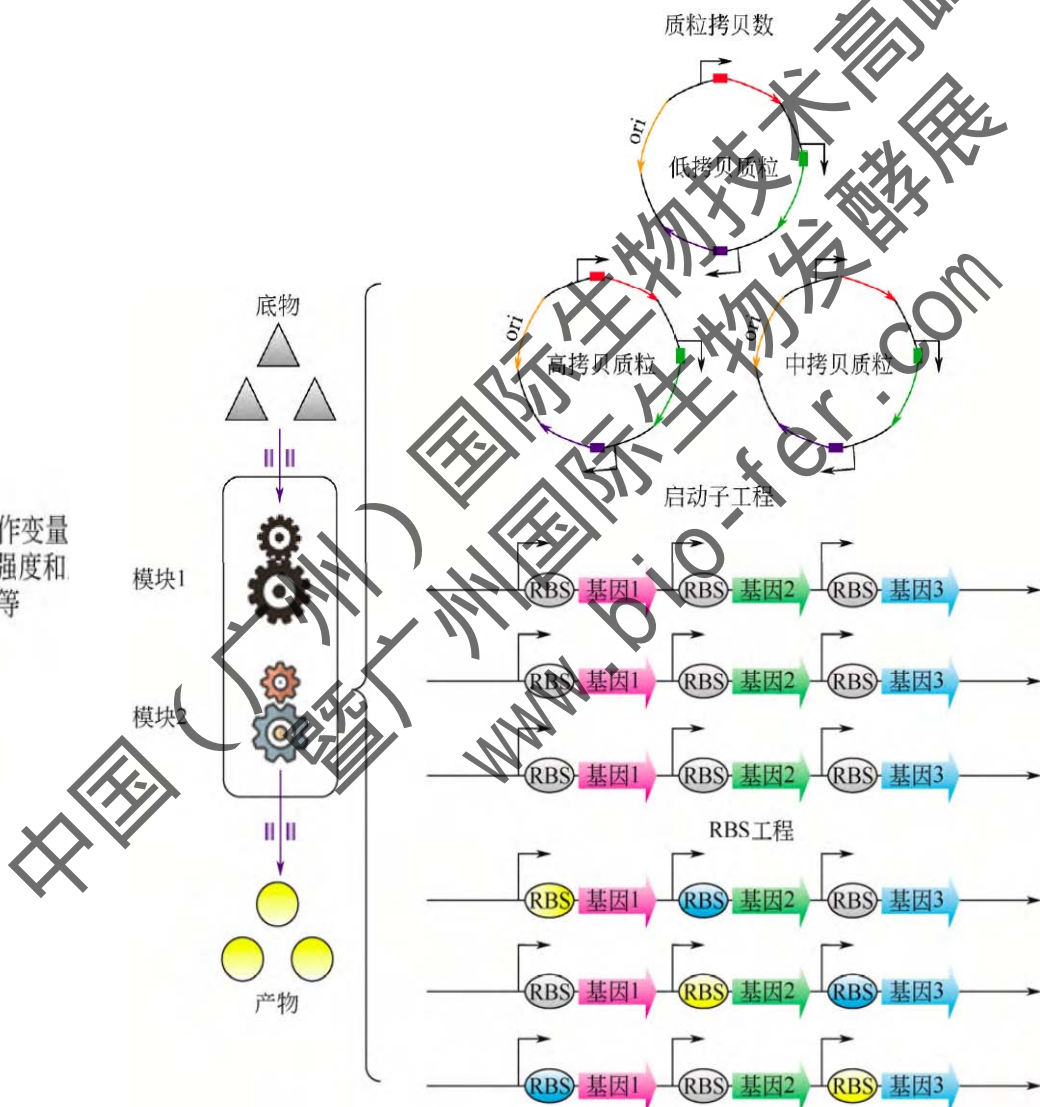
# 工业菌的代谢工程育种

## 多元模块工程 (multivariate modular metabolic engineering)

### 多元模块工程原理

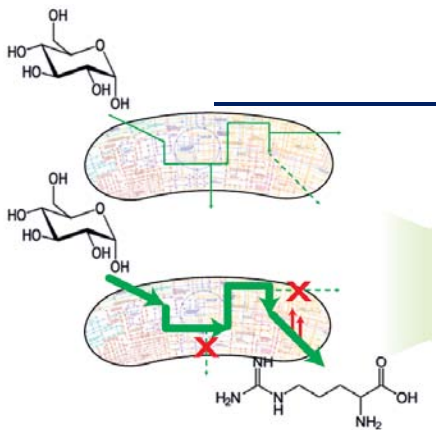


### 模块强度的调控方法



菌株	产品	模块划分	调控方法
<i>E. coli</i>	紫杉醇	(1) MEP 途径; (2) 萜类化合物合成途径	质粒拷贝数; 启动子
<i>E. coli</i>	脂肪酸	(1) 乙酰辅酶 A 形成; (2) 乙酰辅酶 A 激活; (3) 丙酰辅酶 A 消耗	质粒拷贝数
<i>E. coli</i>	白藜芦醇	(1) 酰基辅酶 A 形成; (2) 白藜芦醇合成; (3) 丙酰辅酶 A 形成	质粒拷贝数; 启动子
<i>E. coli</i>	L-酪氨酸	(1) 莽草酸模块; (2) 酪氨酸模块	质粒拷贝数; 启动子; 密码子优化; 操纵子布置
<i>E. coli</i>	$\beta$ 胡萝卜素	(1) MEP 途径; (2) $\beta$ 胡萝卜素合成; (3) PP 途径; (4) TCA 循环; (5) ATP 合成	mRs 元件
<i>E. coli</i>	丹参素	(1) 酪氨酸合成; (2) 葡萄糖利用; (3) 磷酸烯醇式丙酮酸-酪氨酸; (4) 莽草酸-分支酸	Bldbrick 系统元件
<i>Bacillus subtilis</i>	N-乙酰葡萄糖胺	(1) N-乙酰葡萄糖胺合成; (2) 糖酵解途径; (3) 肽聚糖合成	启动子; sRNA
<i>Yeast</i>	富马酸	(1) 还原模块; (2) 氧化模块; (3) 副产物模块	质粒拷贝数; 启动子; 支架蛋白; sRNA

# 代谢工程系统的优化策略

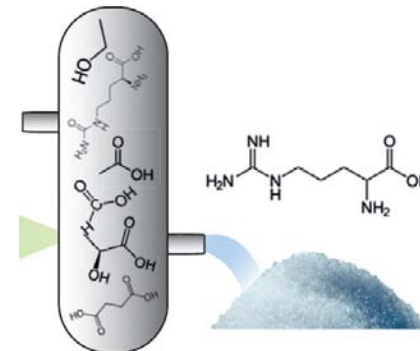
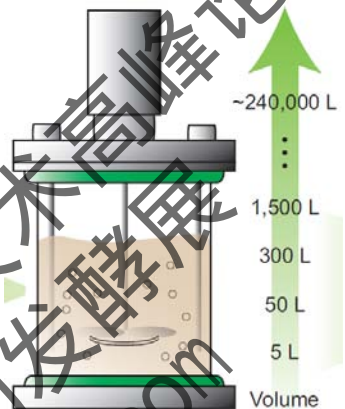


## 菌种选育（上游）

- 微生物宿主菌选择：GRAS
- 产物的生物合成途径：重新构建
- 产物耐受性：性能提高
- 负调控机制：敲出或缺失
- 辅助因子和前体优化：代谢流改变
- 代谢流优化：相关的生物合成途径
- 高通量工具：在生物系统水平上分析代谢

## 发酵（中游）

- 利用廉价、易获得、效果好的碳源和基础培养基
- 优化培养条件和流加策略
- 分批和半连续培养工艺
- 产品生产评估
- 反应器放大

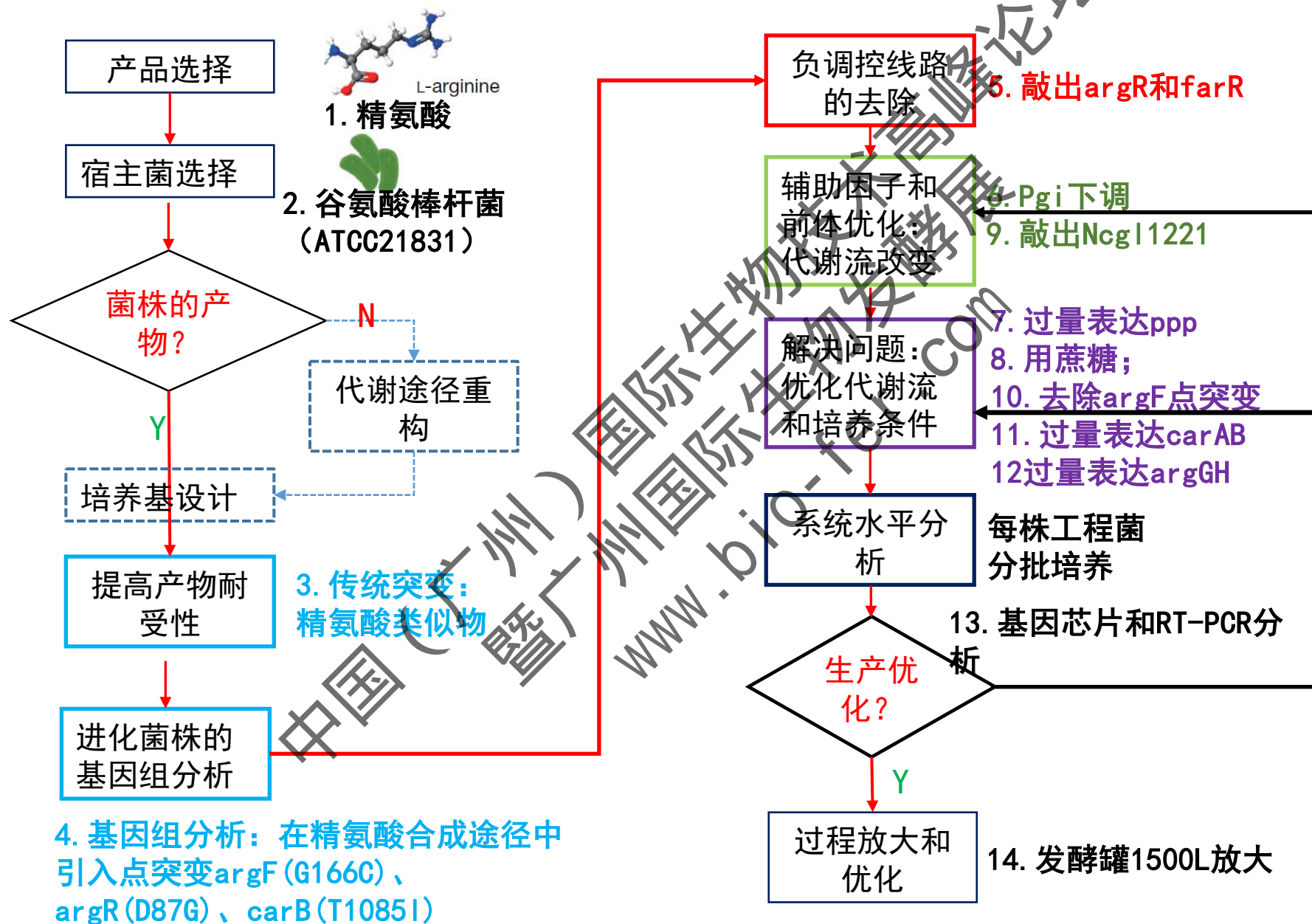


## 分离纯化（下游）

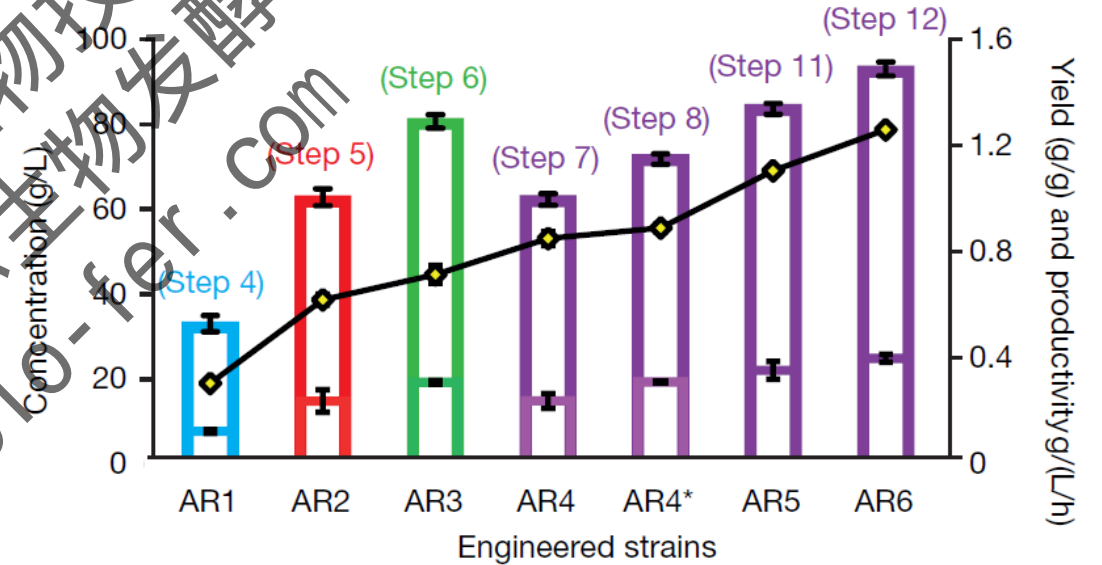
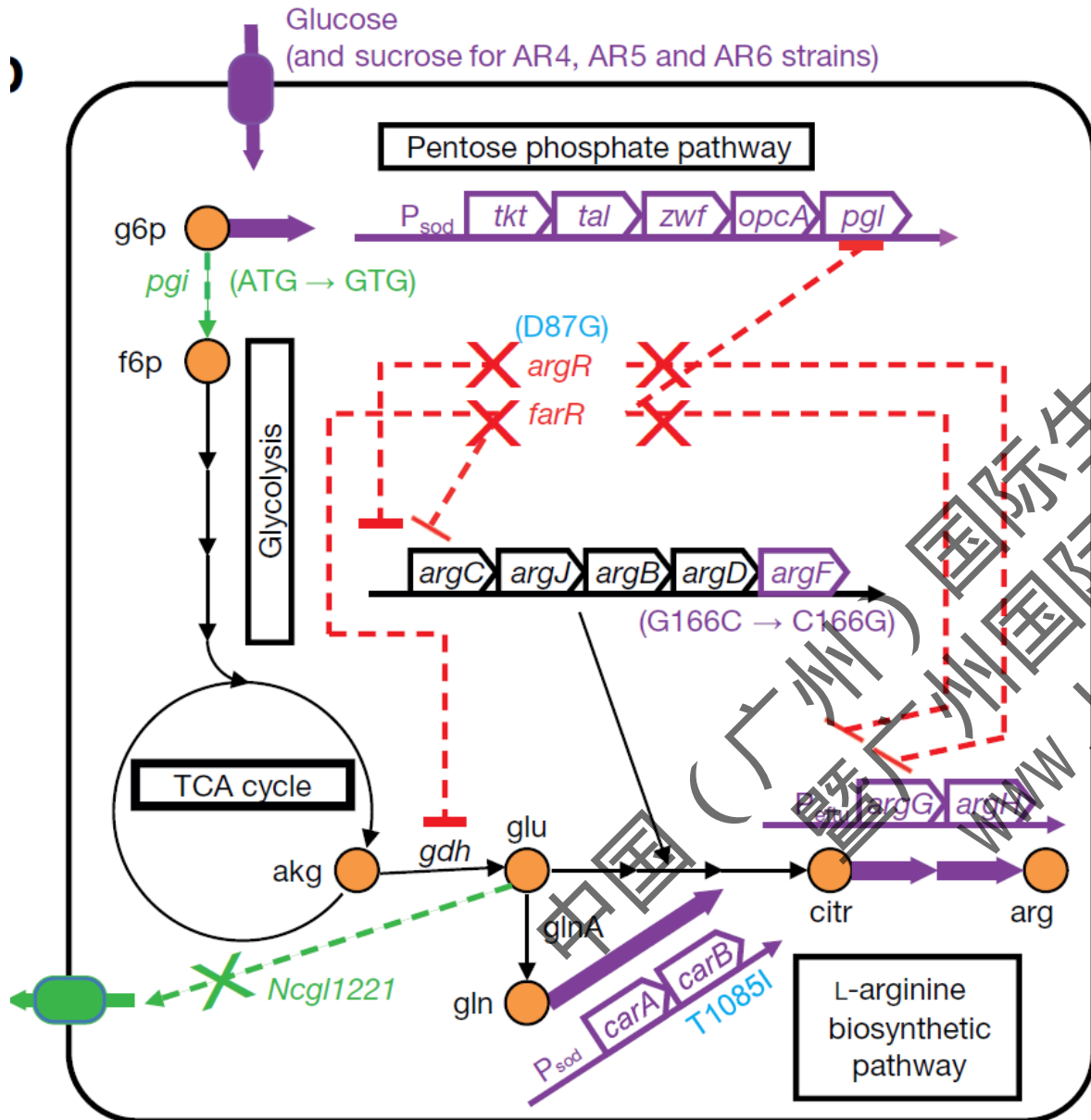
- 利用廉价、易获得、效果好的碳源和基础培养基
- 减少副产物
- 优化培养条件（低pH）

重复设计和构建菌株

# 代谢工程系统的优化谷氨酸棒杆菌生产L-精氨酸

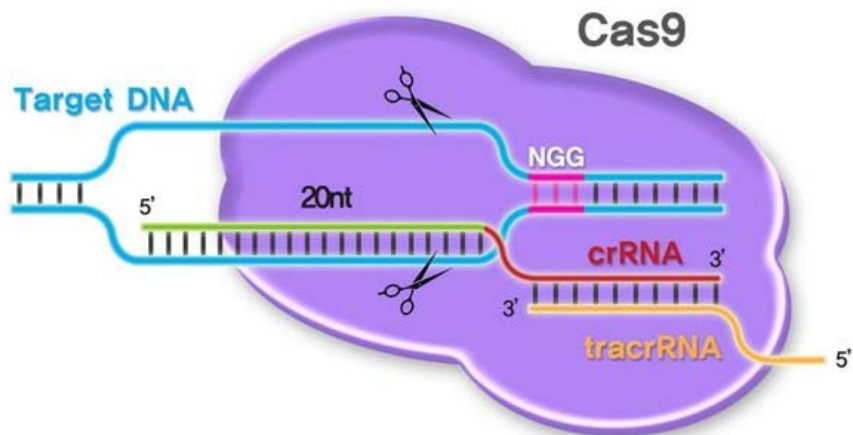


# 代谢工程系统的优化谷氨酸棒杆菌生产L-精氨酸



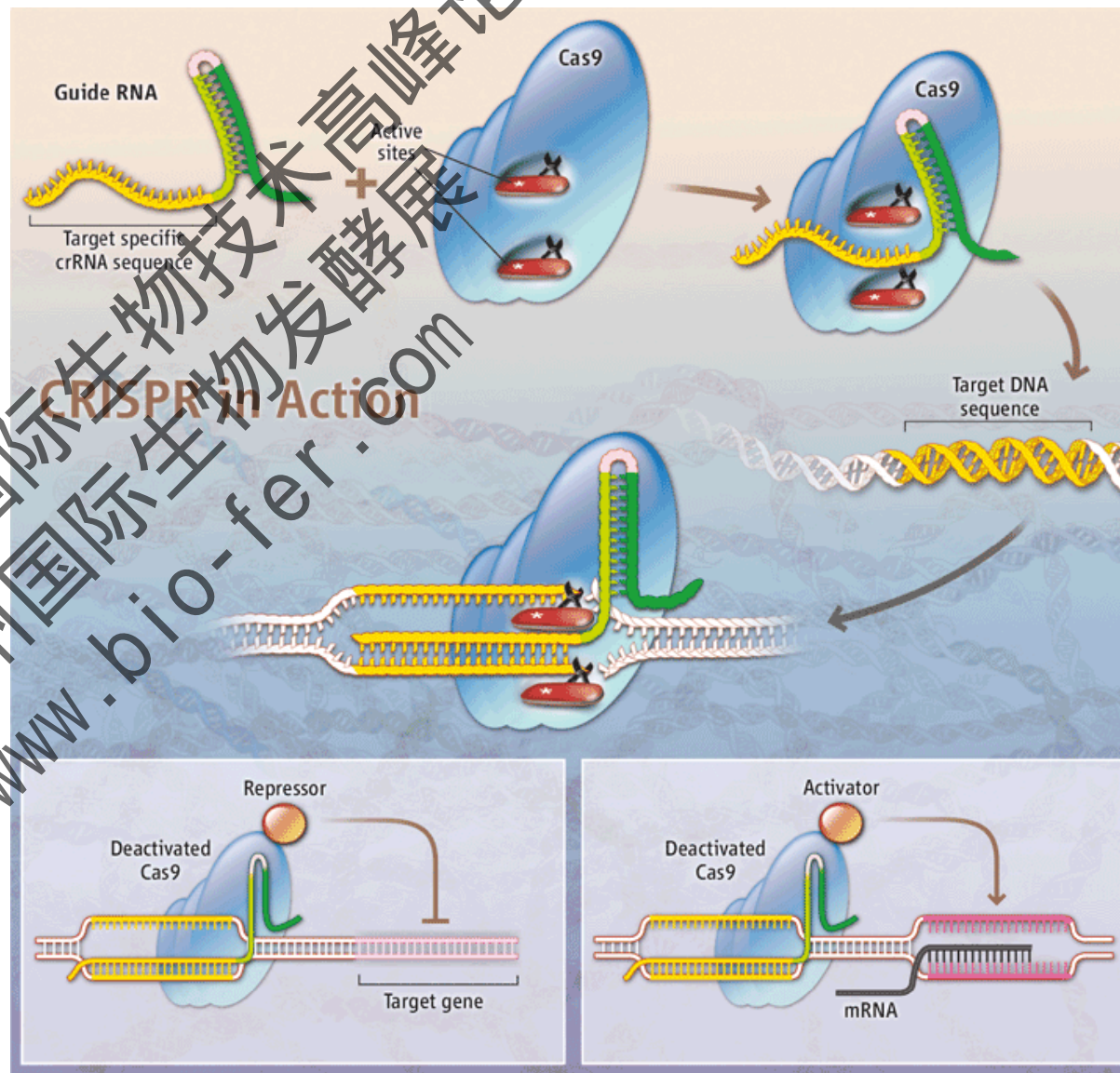


# 基因组编辑技术CRISPR/CAS9与微生物菌种选育

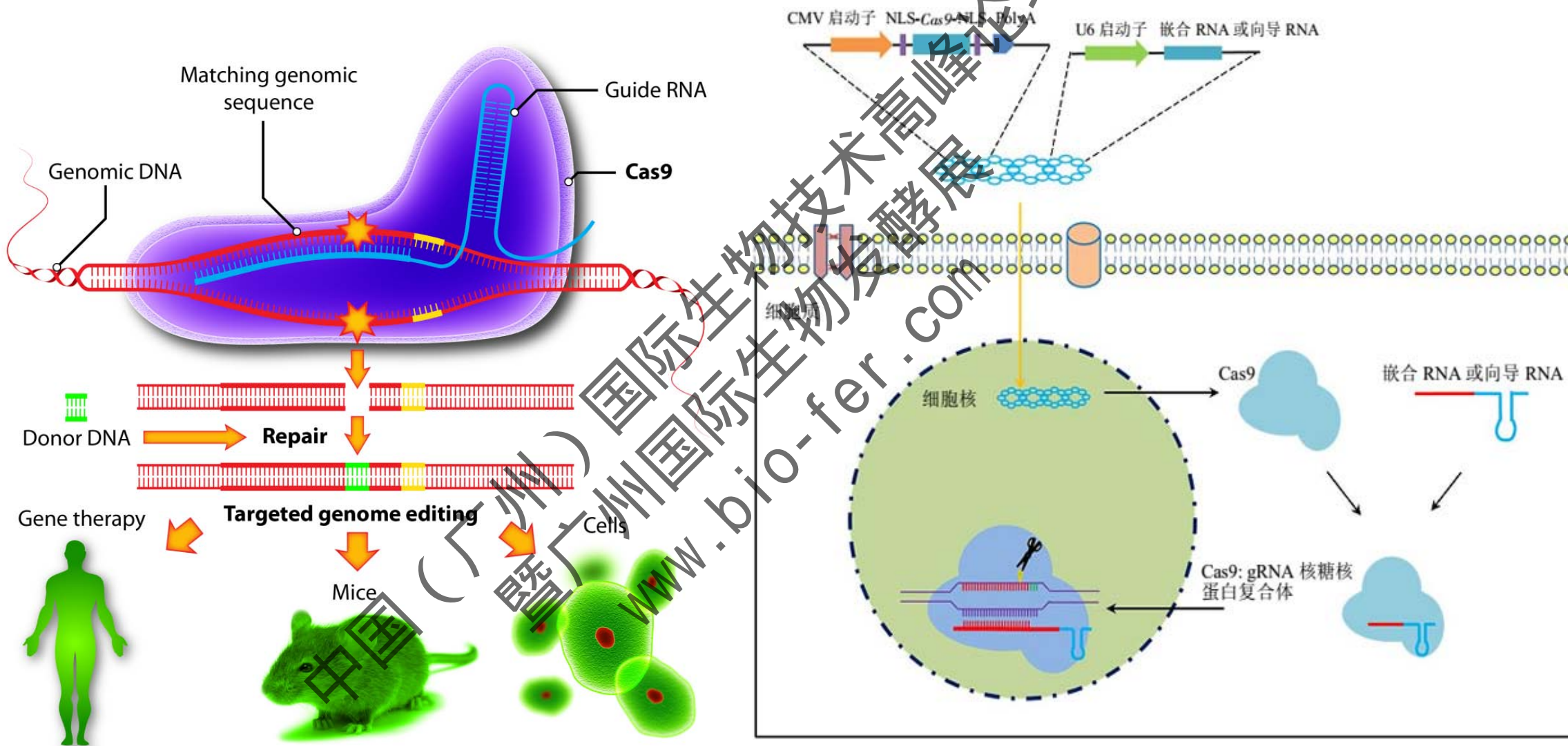


## CRISPR/CAS9基因编辑系统组成:

- Cas9蛋白
- crRNA+tracrRNA=gRNA
- 20nt+PAM (NGG) = protospacer



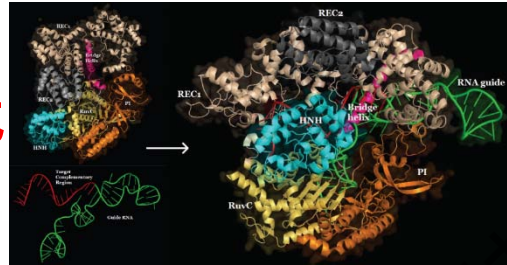
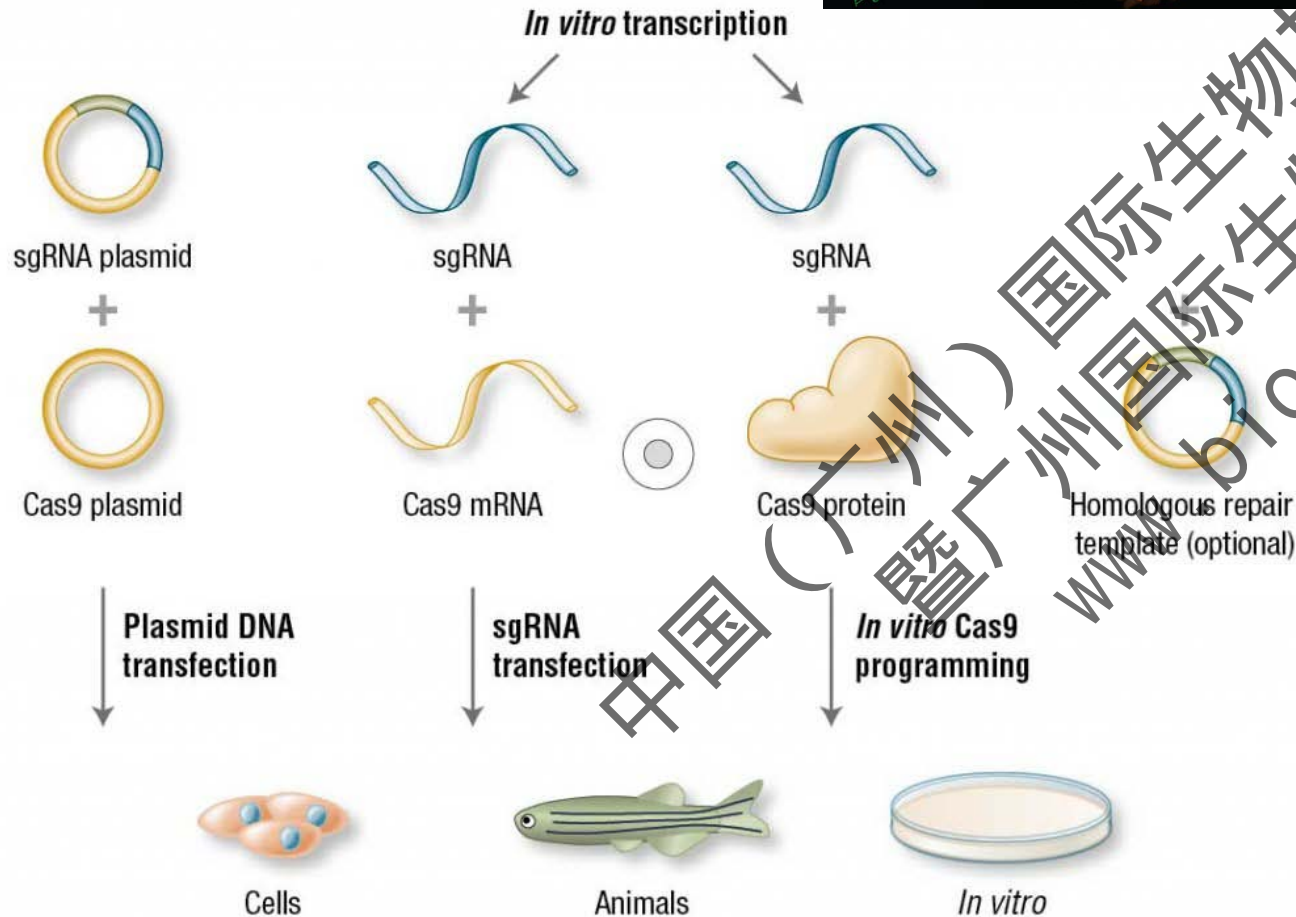
# 基因组编辑技术CRISPR/CAS9与微生物菌种选育



# 基因组编辑技术CRISPR/CAS9、基因分子育种、传统育种

IN FOCUS NEWS

## CRISPR/CAS9基因组编辑不同方式



BIOTECHNOLOGY

## Gene-edited CRISPR mushroom escapes US regulation

A fungus engineered using CRISPR-Cas9 can be cultivated and sold without oversight.

BY EMILY WALTON

The US Department of Agriculture (USDA) will not regulate a mushroom that has been genetically modified with the gene editing tool CRISPR-Cas9, the agency has confirmed. The long-awaited decision means that the mushroom can be cultivated and sold without passing through the agency's regulatory process — making it the first CRISPR-edited organism to receive a green light from the US government.

"The research community will be very happy with the news," says Caixia Gao, a plant biologist at the Chinese Academy of Sciences Institute of Genetics and Developmental Biology in Beijing, who was not involved in developing the mushroom. "I am confident we'll see more gene-edited crops falling outside of regulatory authority."

Yinong Yang, a plant pathologist at Pennsylvania State University (Penn State) in University Park, engineered the fungus — the common white button mushroom (*Agaricus bisporus*) — to resist browning. The effect is achieved by targeting the family of genes that encodes polyphenol oxidase (PPO), an enzyme that causes browning. By deleting just a handful of base pairs in the mushroom's genome, Yang knocked out one of six PPO genes — reducing the enzyme's activity by 30%.



The common white button mushroom (*Agaricus bisporus*) has been modified to resist browning.

official. "They were very excited," Yang says. The United States is revamping its rules for regulating GMOs, which collectively are

美国农业部相继豁免了一种基因编辑蘑菇和一种基因编辑玉米的监管，主要是由于基因编辑CRISPR/CAS9后的作物，不含任何新引入的遗传物质或外源DNA。

# 基因组编辑技术CRISPR/CAS9、基因分子育种、传统育种

宾州州立大学用基因编辑而来的抗褐化的蘑菇 (CRISPR-edited mushroom)  
杜邦先锋种子公司的基因编辑而来的糯玉米 (CRISPR-edited Waxy Corn)



美国农业部对宾州大学Yang教授申请CRISPR1Cas9所得的抗褐化蘑菇商业化的回信

United States  
Department of  
Agriculture

Animal and  
Plant Health  
Inspection  
Service

Biotechnology  
Regulatory  
Services

4700 River Road  
Riverdale, MD  
20737

Dr. Yinong Yang  
College of Agricultural Sciences  
The Pennsylvania State University  
211 Buckhout Laboratory  
University Park, PA 16802

Re: Request for confirmation that transgene-free, CRISPR-edited mushroom is not a regulated article

大意说：你的来信表述用CRISPR/Cas9技术所得的蘑菇不含任何外源基因。APHIS没有理由认为你的蘑菇含有昆虫也没有理由认为会增加杂草，所以不受转基因条款7 CFR part 340管控（即无需按转基因产物条款处理）

Dear Dr. Yang:

信的后面还说了CRISPR1Cas9技术所得的蘑菇将按一般蘑菇的田间释放和检疫程序处理，但你还妻咨询FDA和EPA的有关管控条

Based on the information cited in your letter, APHIS has concluded that your CRISPR/Cas9-edited white button mushrooms as described in your letter do not contain any introduced genetic material. APHIS has no reason to believe that CRISPR/Cas9-edited white button mushrooms are plant pests. Therefore, consistent with previous responses to similar letters of inquiry, APHIS does not consider CRISPR/Cas9-edited white button mushrooms as described in your October 30, 2015 letter to be regulated pursuant to 7 CFR part 340. Additionally, white button mushroom is not listed as a Federal noxious weed pursuant to 7 CFR part 360, and APHIS has no reason to believe that the anti-browning phenotype of your white button mushroom would increase the weediness of white button mushroom.



United States  
Department of  
Agriculture

Dr. Daria H. Schmidt  
Director, Registration and Regulatory Affairs – North America  
DuPont Pioneer  
7100 NW 62<sup>nd</sup> Avenue  
Johnston, IA 50131-1000

USDA对杜邦先锋种子公司申请CRISPR-Cas基因编辑糯玉米管控法规的答复  
Re: Confirmation of Regulatory Status of Waxy Corn Developed by CRISPR-Cas Technology

USDA的这2封回答信件，确认CRISPR-Cas9而来的防褐化蘑菇和糯玉米不受转基因法规管控。原因就是有一个，没有引进外源遗传物质。

Dear Dr. Schmidt:

Thank you for your letter dated December 14, 2015 inquiring whether or not the corn

APHIS has reviewed the information in your letter and agrees that the CRISPR-Cas waxy corn you described is a null segregant line that contains a targeted deletion of the waxy gene (*Wx1*). APHIS also agrees that no plant pests or genetic material from plant pests were used in the development of CRISPR-Cas waxy corn. APHIS has no reason to believe that this CRISPR-Cas waxy corn is a plant pest. Therefore, consistent with previous responses to similar letters of inquiry, APHIS does not consider the CRISPR-Cas waxy corn as described in your December 14, 2015 letter to be regulated pursuant to 7 CFR part 340. Additionally, corn is not listed as a Federal noxious weed pursuant to 7 CFR part 360, and APHIS has no reason to believe that the genetic alteration of your CRISPR-Cas waxy corn would increase the weediness of corn.

APHIS认为你们的CRISPR-Cas技术而来的糯玉米不受转基因法规7CFRPart340管控也不受7CFR Part346管控

Please be advised that your CRISPR-Cas waxy corn may still be subject to other regulatory authorities such as FDA or EPA.

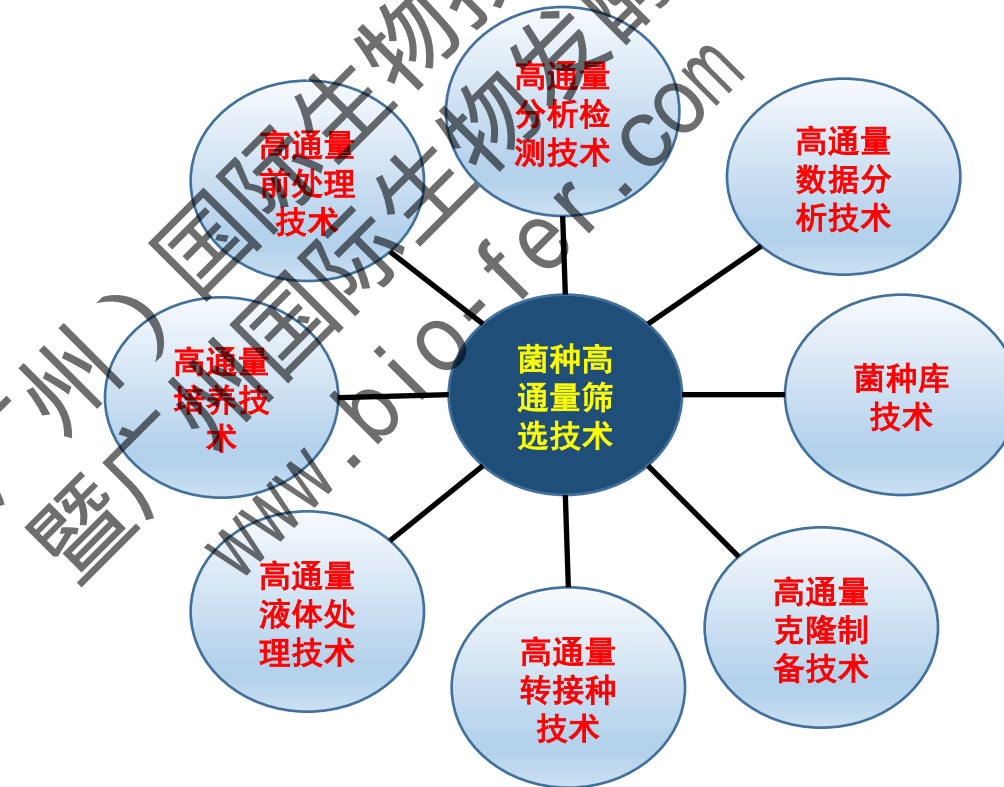
但是你们的CRISPR-Cas糯玉米可能还需要受FDA, EPA等有关法规的管控

Should you become aware at any time of any issues or additional information that may affect the Agency's conclusion regarding this inquiry, you must immediately notify the Agency in writing of the nature of the issue. We hope you appreciate our commitment to plant health and support for the responsible stewardship for the introduction of GE plants.

# 菌种的高通量筛选技术

- **高通量筛选系统**：进行培养基灭菌、倒平板、挑取单菌落、分装发酵培养基、接种、抽提、HPLC（高效液相色谱）分析和数据自动收集处理等过程，即组合成一套连续的自动化系统，实现高效自动化筛选，从而大大提高筛选效率。
- **微生物菌种筛选手段的发展趋势**：自动化、微量化、通量化、仪器化。

## 菌种高通量筛选技术路线组成



# 菌种高通量筛选技术路线组成

## 微生物菌种筛选一般流程



1 培养基注入



2 注入完成

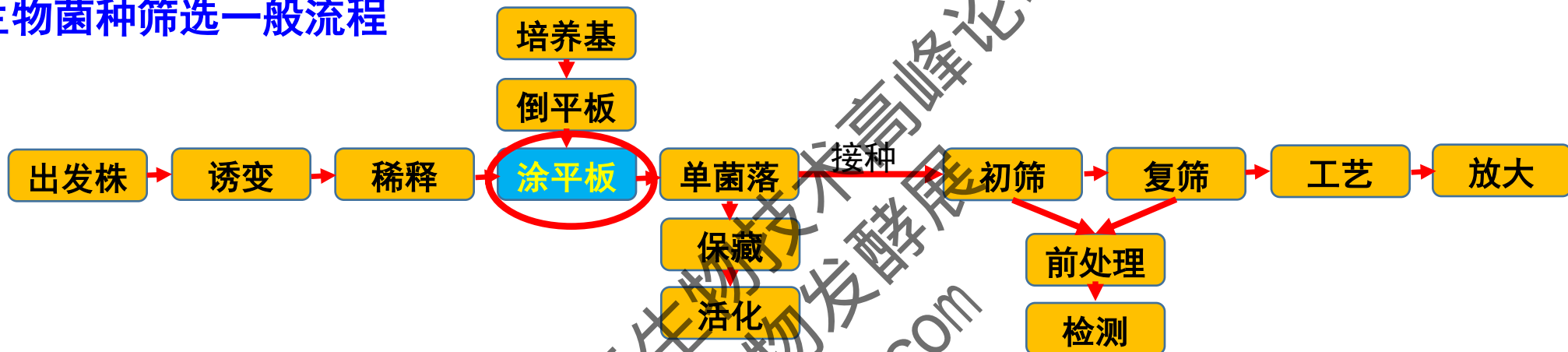


3 培养皿加盖



# 菌种高通量筛选技术路线组成

## 微生物菌种筛选一般流程



### 全自动螺旋接种仪



使用超级方便  
标准GL45型盖子和CPC  
硅酮管子使您方便与安全维护

容量2L清洗瓶  
可完成500次清洗

全自动消毒  
接种针的内部和外部由溢出的液体来清洗，无交叉污染

样品区域  
快速精确地吸取样品

全不锈钢的机壳  
结构紧凑，宽度38 cm

### easySpiral 螺旋接种仪



清洗液感应器  
洗瓶空时报警

旋转臂设计  
一个全自动循环仅需25秒

模块化培养皿底座  
可操作90和150 mm培养皿

轻触式控制面板  
在超净台中工作更简便舒适

1键式设计  
无需额外培训

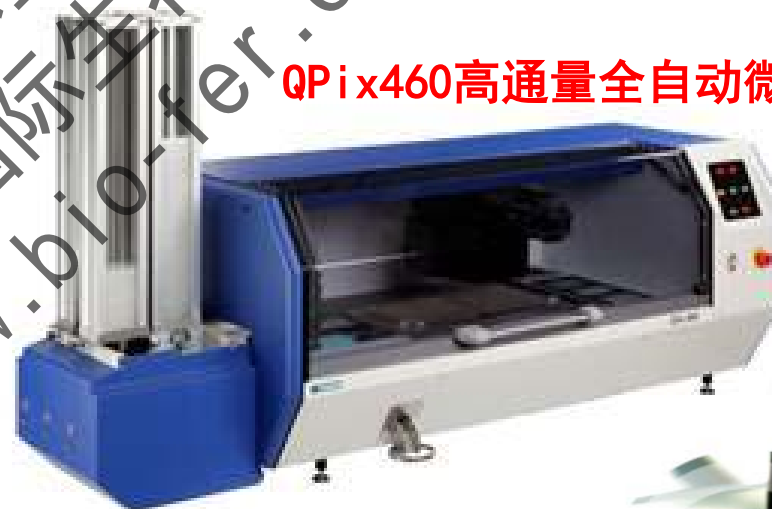
# 菌种高通量筛选技术路线组成

## 微生物菌种筛选一般流程



全自动克隆挑选系统Qpix Expression  
(英国Genetix)

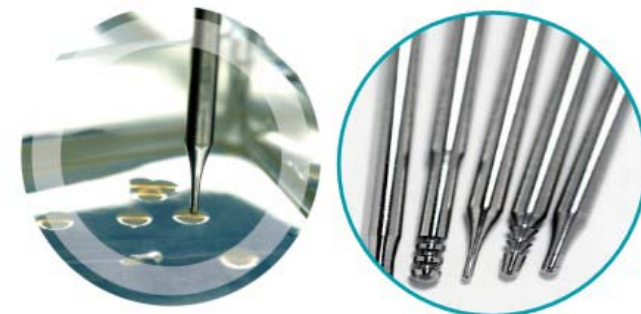
(中国科学院天津工业生物技术研究所)



QPix460高通量全自动微生物克隆筛选平台

30000克隆/天

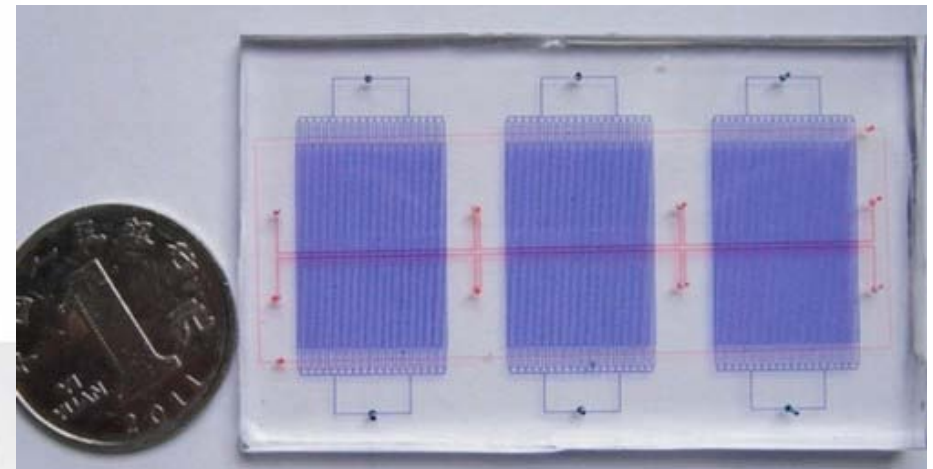
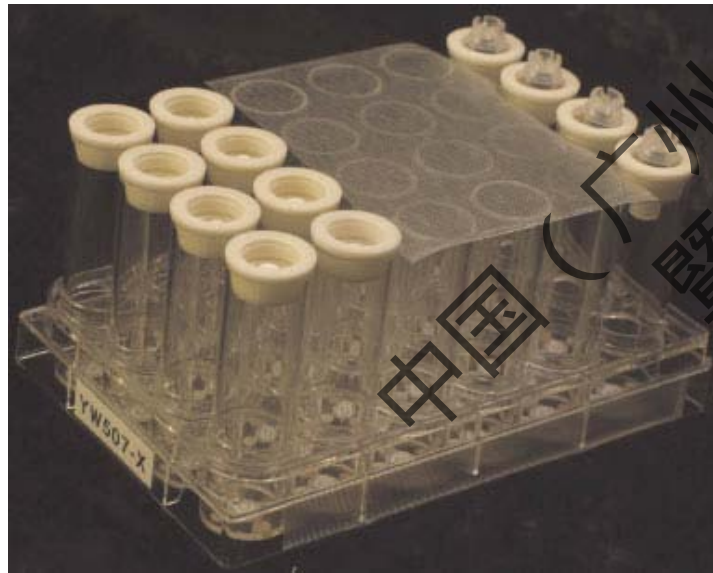
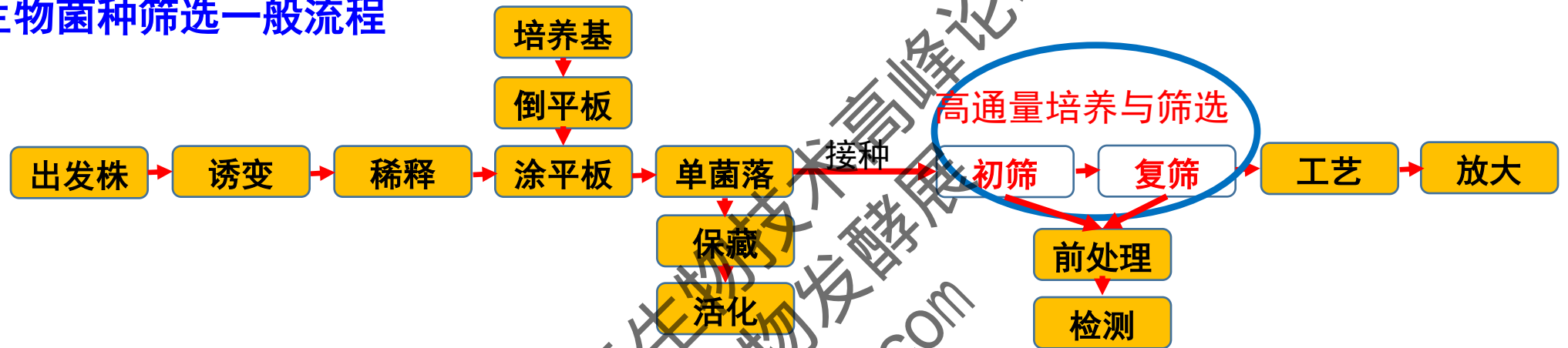
英国Genetix公司



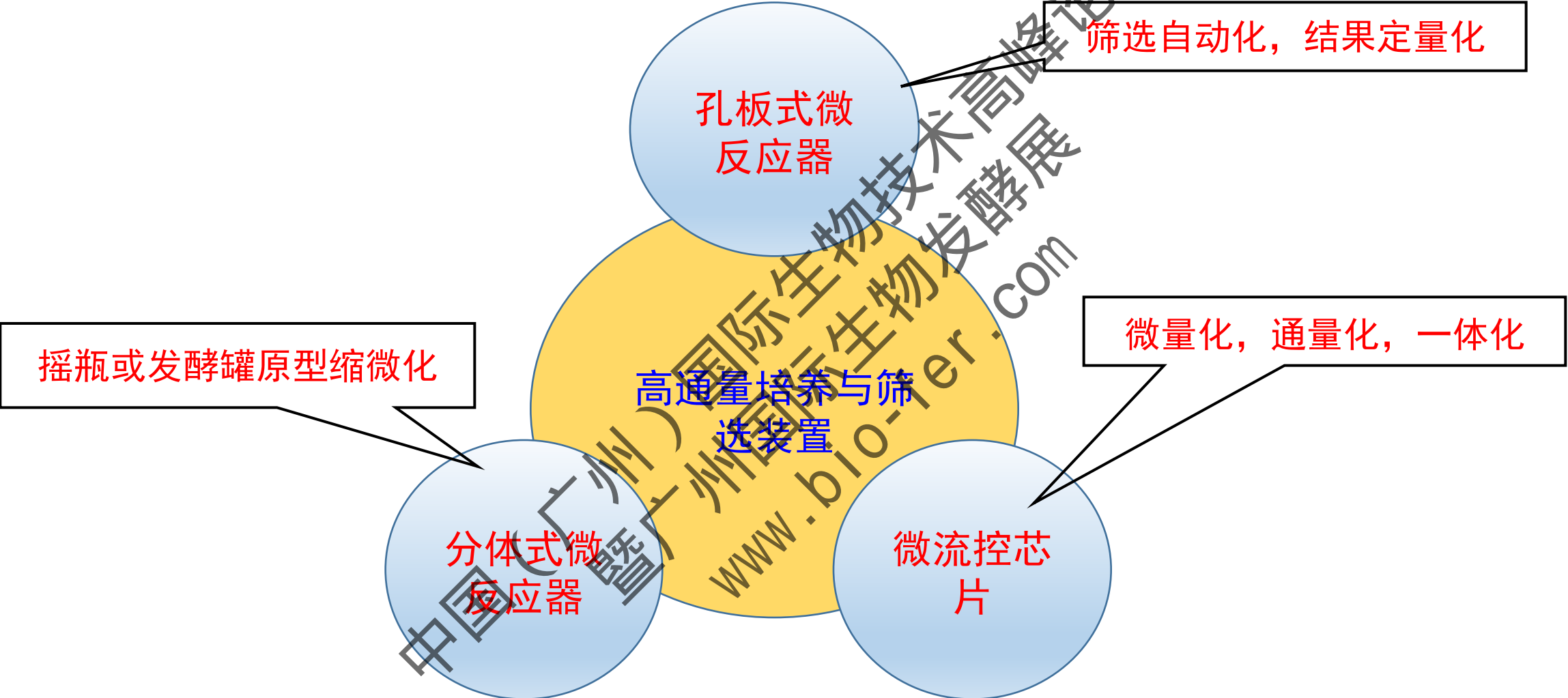


# 菌种高通量筛选技术路线组成

## 微生物菌种筛选一般流程



# 菌种的高通量培养与筛选装置

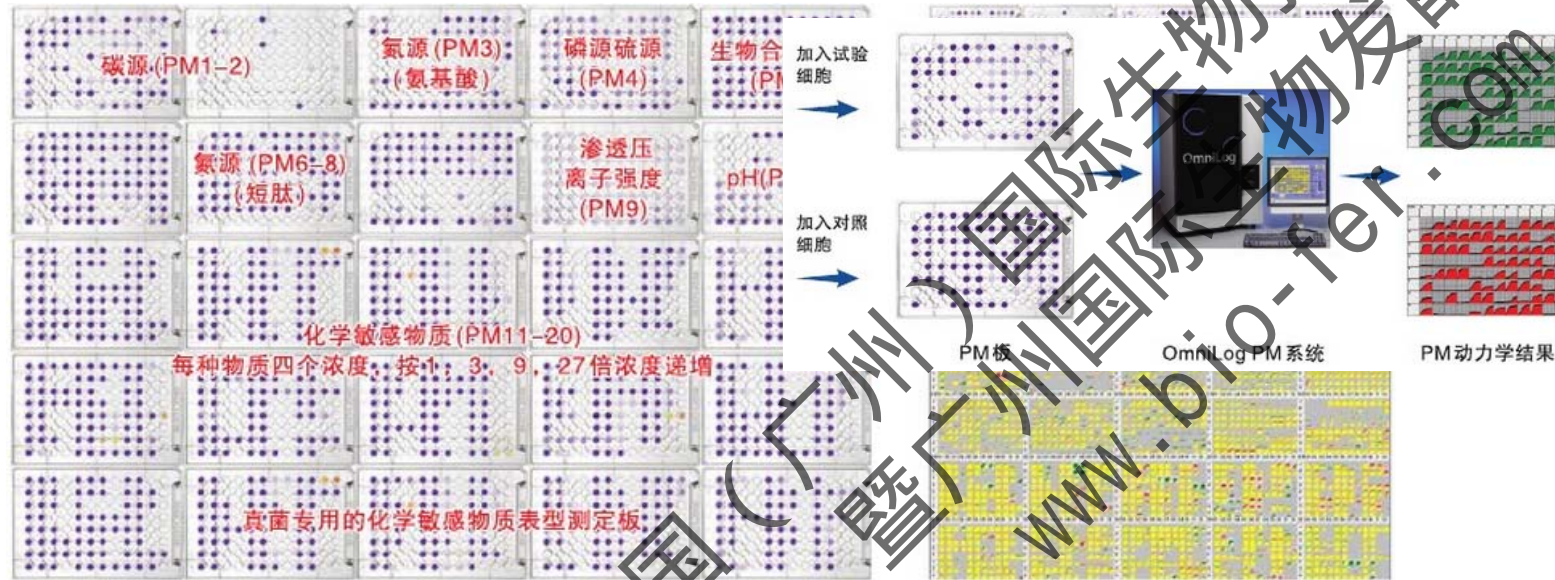


# 高通量培养与筛选装置

## 孔板式微反应器 (MTP)

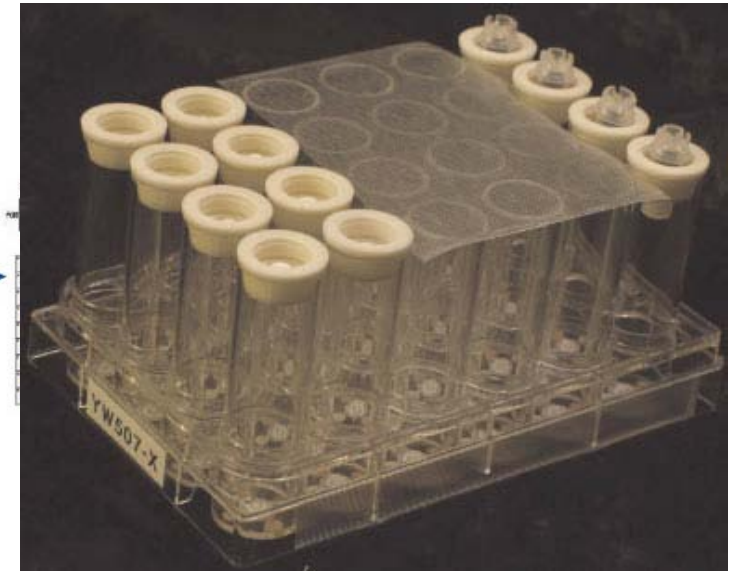
微孔板是自动高效筛选的标准方式：筛选自动化，结果定量化，可与自动化机械、液体处理系统、光学读板仪等相匹配。MTP 格式可提供 (6~1536孔)，但 24 孔、48 孔和 96 孔格式是最常用的。

### PM表型分析微阵列系统 (phenotype microArray, 美国 Biolog)



25种PM板, 2400个表型测试, 2400条动力学曲线, 海量信息……

- 2000 多种培养条件, 用以检测微生物的生长、呼吸、代谢等不同的表型。
- 高通量培养系统: 200 种碳源、400 种氮源、100 多种磷源和硫源、100 种营养补充剂以及不同范围的 pH 值、渗透压、离子浓度等生长环境。

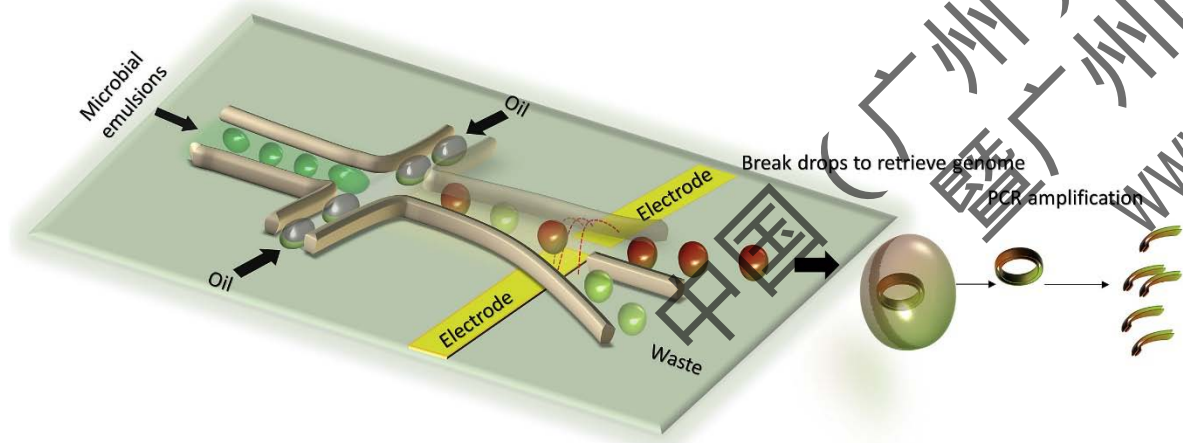


M24微反应器是一个深孔板格式的微型反应器系统, 包含 24 个圆柱形无挡板的深孔, 工作体积为5mL。

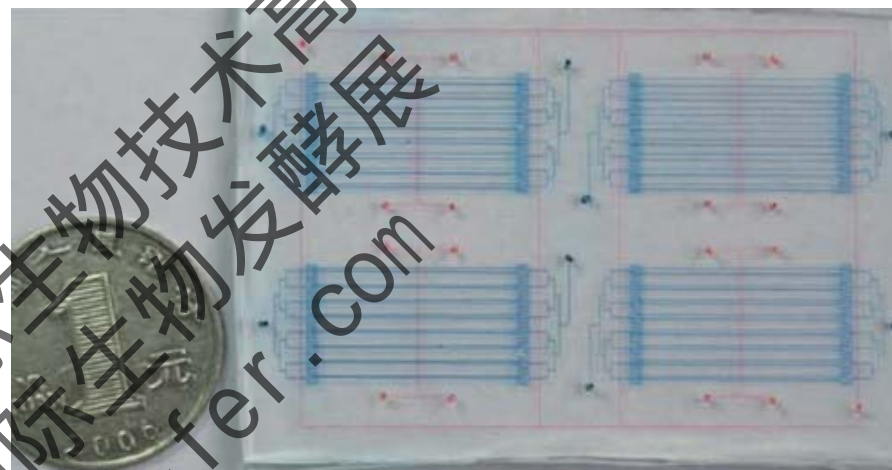
# 高通量培养与筛选装置

## 微流控式芯片实验室 (Microfluidic-based lab-on-a-chip)

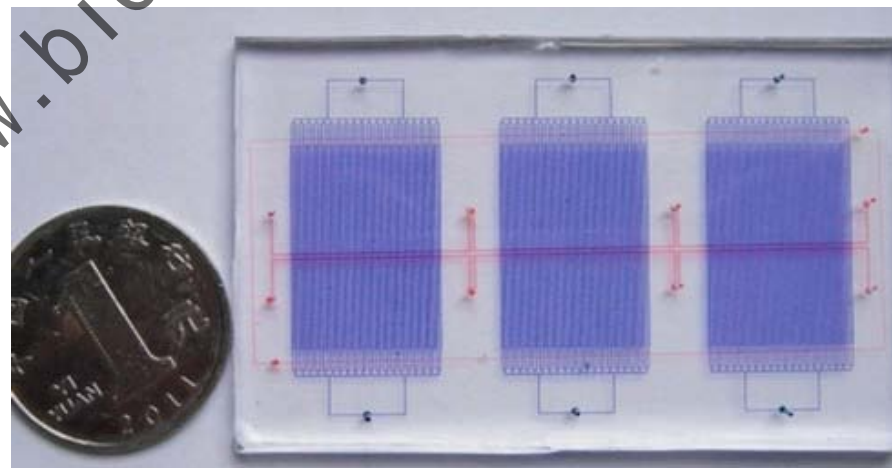
- 微流控式芯片实验室” (lab-on-a-chip) , 微流控技术 ( Microfluidics ) 把生物、化学、医学分析过程的样品制备、反应、分离、检测等基本操作单元集成到一块微米尺度的芯片上, 自动完成分析全过程。
- 有着体积轻巧、使用样品及试剂量少, 且反应速度快、可大量平行处理及可即用即弃等优点的微流控芯片。



### 高通量微生物培养芯片



第一代32通道细菌悬浮培养芯片



第二代120通道微生物悬浮培养芯片

中科院苏州纳米技术与纳米仿生研究所

芯片在 $7.5 \times 5 \text{ cm}^2$ 面积上集成32个独立平行的微生物培养单元, 每个单元培养体积仅为**50nL**。

大肠杆菌、枯草芽孢杆菌、施氏假单胞菌、运动发酵单胞菌等重要工业细菌的悬浮培养测试。

# 高通量培养与筛选装置

分体式微型生物反应器 (miniature bioreactor, MBR)

摇瓶或发酵罐原型缩微化

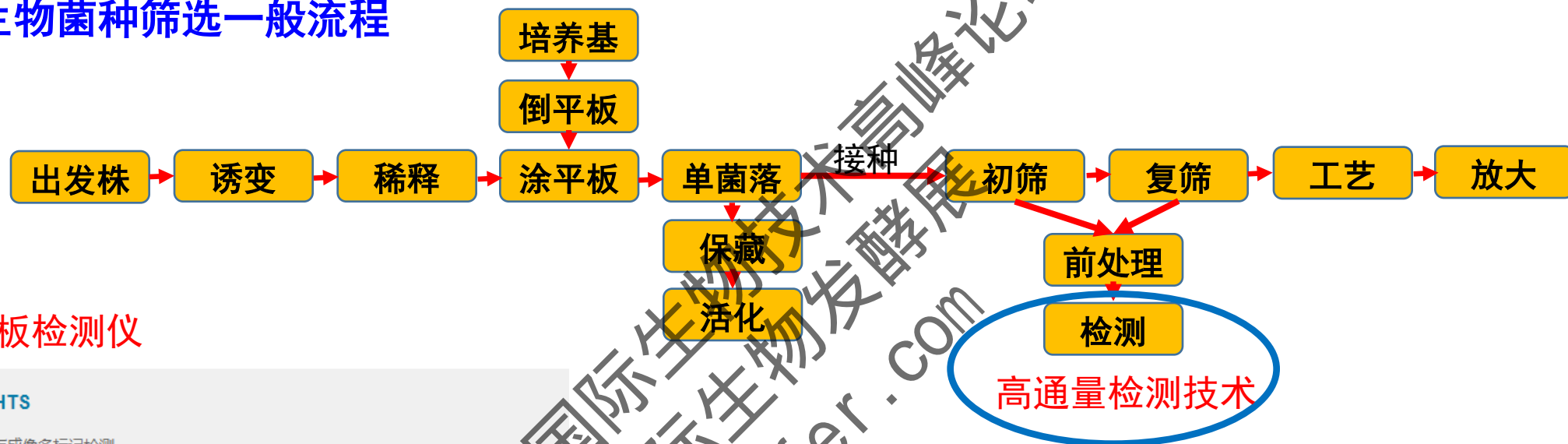
BioXplorer 100



BioXplorer 100是高通量的生物筛选系统，专为发酵工作设计，工作体积从20ml至150ml，8个单独控制的生物反应器。可以适应包括微生物发酵、C1气体任何应用发酵与细胞培养。

# 菌种高通量筛选技术路线组成

## 微生物菌种筛选一般流程



## 高通量微孔板检测仪



### ViewLux uHTS

功能：CCD整板成像多标记检测

特点：基于超低温、背照式、高灵敏、低噪音 CCD 相机检测的整板成像系统；高灵敏度专用广角滤光片优化光路；每小时检测超过 200,000 个样品；包括放射同位素标记在内的超高通量多标记检测系统；超大容量全自动载板架；微孔板条形码识别。

检测200,000个样品/小时

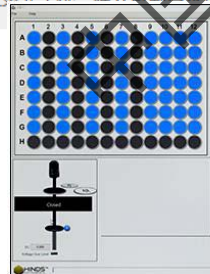


### EZ Reader

功能：微流控酶动力学检测 (MSA)

特点：基于毛细管电泳和微流控两种技术，通过酶促反应后产物和 (Mobility-Shift Assay)，直接分离并实时动态检测底物和其他特殊组分，同时可以排除化合物自发荧光干扰，独立检测。

## 微流控制芯片检测



## 流式细胞仪



## 高通量检测技术：

- 微孔板的使用和光学检测法
- 报告基因
- 流式细胞技术
- 芯片检测

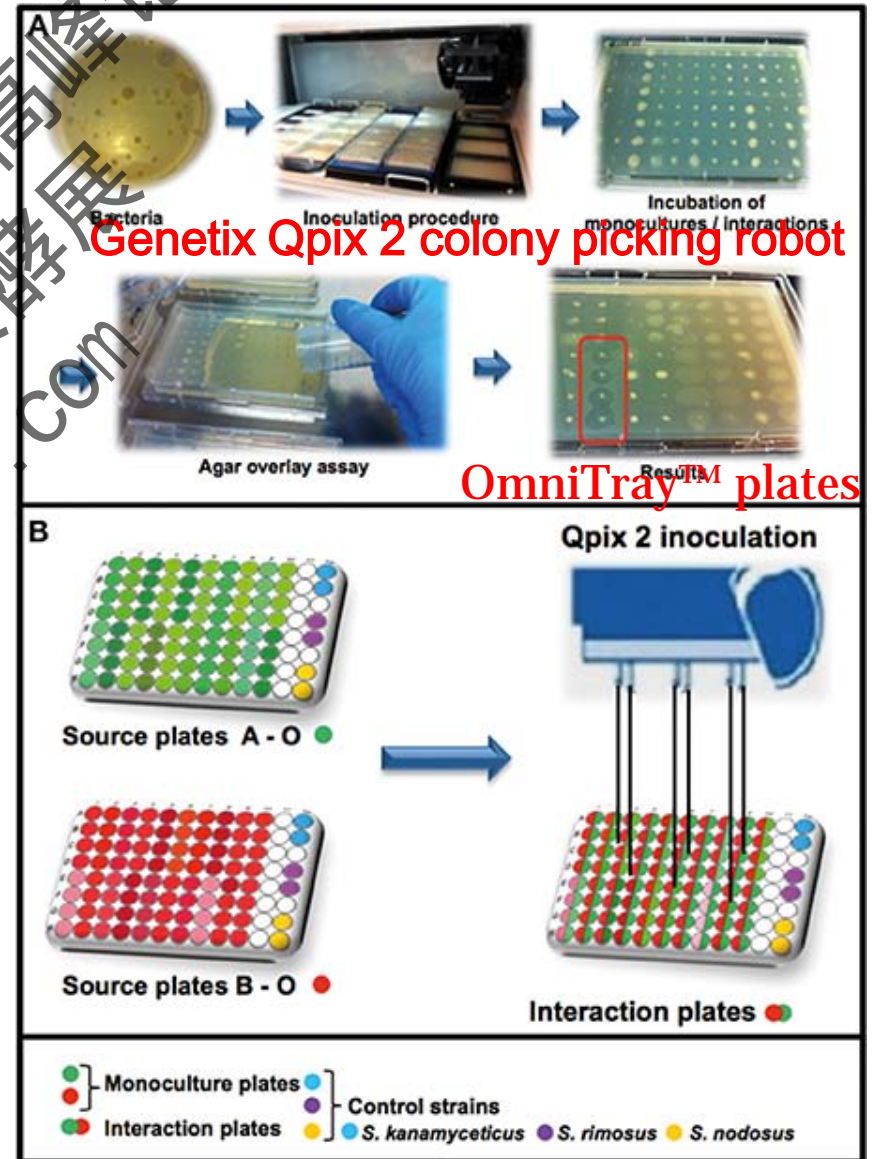
# 菌种高通量筛选技术的认识

## 菌种高通量筛选技术基础

- 培养：高通量（微型化）培养技术
- 前处理：高通量（微型化）样品处理方法
- 检测分析：高通量（微型化）产物分析方法
- 生理参数分析：高通量（微型化）过程生理参数分析

菌种高通量筛选技术是一整套高通量技术的有机整合。

细菌的高通量培养与抗性筛选过程





Thank You!



中国 (广州) 国际生物技术高峰论坛  
暨广州国际生物发酵展  
www.bio-fer.com