ICS 07.080
CCS A 21

中华人民共和国国家标准

GB/T 38490—2021

微生物高通量适应性进化测定 微流控芯片法

Determination of high-throughput adaptive evolution for microorganisms—Microfluidic chip method

2021-12-31 发布　　2022-07-01 实施

国家市场监督管理总局
国家标准化管理委员会　发布

前　言

本文件按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则　第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由中国标准化研究院提出并归口。

本文件起草单位：清华大学、洛阳华清天木生物科技有限公司、中国标准化研究院。

本文件主要起草人：张翀、邢新会、剪兴金、李梅、王立言、郭肖杰、张乐乐、马爱进。

微生物高通量适应性进化测定 微流控芯片法

1 范围

本文件规定了用微流控芯片法测定微生物高通量适应性进化的方法。

本文件适用于利用微流控芯片法对不产生表面活性剂的单细胞形态可培养微生物的高通量适应性进化的测定。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；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 分析实验室用水规格和试验方法

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

适应性进化 adaptive evolution

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过程。

3.2

适合度 fitness

生物体或生物群体对环境适应的量化特征，是评估生物所具有的各种特征的适应性，以及在进化过程中继续往后代传递能力的指标。

4 原理

在微生物培养芯片上生成培养基包裹菌体的微液滴，通过液滴在芯片主管道中的往复运动使微生物在芯片上生长繁殖，通过液滴分割融合操作实现培养基的不断补充和更换，实现微生物连续传代，以实现微生物对特定培养条件的适应性进化，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 试剂和材料

除非另有规定，仅使用分析纯试剂。

5.1 水

GB/T 6682，一级水。

5.2 培养基

根据不同菌株的需求配置相应的培养基，高温高压灭菌后置于 4 ℃冰箱保存备用。

5.3 油相

配制含 10 g/L 司盘-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 微生物微液滴培养仪。

6.2 微生物培养芯片。

7 适应性进化操作步骤

7.1 菌体准备与培养

7.1.1 菌体准备

从冻存管中蘸取菌液涂布于固体培养基上活化，在菌体最适生长条件下培养，直至固体培养基上出现便于挑取的单菌落。

7.1.2 菌体培养

在无菌条件下挑取固体培养基上单菌落放入相应的液体培养基中，置于恒温摇床在最适条件下培养至对数生长中后期。

7.2 微生物培养芯片安装及初始化

操作如下：

a) 使用 0.22 μm 的滤膜过滤矿物油，油相进样瓶在 121 ℃下高温高压灭菌 15 min。用无菌针管吸取过滤后的矿物油冲洗微生物培养芯片内部 2 次～3 次。将盛有 60 mL～80 mL 过滤后的矿物油的油相进样瓶和冲洗后的微生物培养芯片置于紫外灯下照射超过 1 h 后，安装至微生物微液滴培养仪相应位置。

b) 设定油水检测激光光压值，设定合适的培养温度，进行初始化操作。初始化时间应大于 6 h。

7.3 样品准备

准备三个试剂进样瓶并编号 A、B、C，清洗后在 121 ℃下高温高压灭菌 15 min。准备新鲜培养基和含一定浓度（根据实验要求而定）胁迫因子的培养基各 8 mL～10 mL；准备用无菌培养基稀释 50 倍的生长到对数生长中后期的菌液 3 mL～5 mL。

用无菌针管先向三个试剂进样瓶侧管注入 4 mL～8 mL 油相。注射完毕旋转进样瓶，让油相浸湿整个进样瓶内部，以同样方式向 A 瓶注入菌液约 3 mL～4 mL，向 B 瓶和 C 瓶分别注入新鲜培养基和含胁迫因子的培养基 6 mL～8 mL，最后注入油相将进样瓶装满；再将试剂进样瓶对应安装进微生物微液滴培养仪中。再次初始化排出试剂进样瓶中的空气，时间应不少于 10 min。

7.4 传代条件设置和液滴生成

选择“适应性进化”功能，设定所需生成液滴的数量和菌体浓度检测波长。

设定传代方式。传代方式有两种：一是根据细菌光密度（optical density，OD）设定，即菌株生长至

所设定的 OD 值后进行传代；二是按时间传代，即培养菌株至所设定的时间后进行传代。可根据实验需求设定传代方式及相应参数。

设定胁迫因子浓度梯度。根据实验需求设定在每次传代过程中所要施加的胁迫因子浓度梯度（最多可设置 8 个梯度）。

运行液滴生成功能，微生物微液滴培养仪自动生成液滴，液滴的体积为 2 μL。

7.5 菌体芯片培养和生长状况监测

液滴生成后，运行液滴培养功能，进行菌体生长状况监测。

7.6 数据处理和结果计算

7.6.1 绘制菌体生长曲线

根据液滴内菌体生长状况监测数据，绘制不同传代批次时菌体生长随时间变化的曲线。

7.6.2 计算菌体的比生长速率

比生长速率可按式(1)计算：

$$\mu=\frac{1}{t_2-t_1}\ln\left(\frac{X_2}{X_1}\right) \qquad \cdots\cdots(1)$$

式中：

μ ——比生长速率，单位为每小时(h^{-1})；

t_2 ——菌体对数生长后期所处的时间，单位为小时(h)；

t_1 ——菌体对数生长前期所处的时间，单位为小时(h)；

X_2——t_2 时刻微生物细胞量，以微生物浊度(OD)计；

X_1——t_1 时刻微生物细胞量，以微生物浊度(OD)计。

根据第一代的微生物生长随时间变化的曲线，观察对数期，选择对数期内的曲线上两点(t_1，X_1)和(t_2，X_2)，利用式(1)计算得到适应性进化前菌体的比生长速率 $\mu(0)$。

根据第 n 次传代后的微生物生长随时间变化的曲线，观察对数期，选择对数期内的曲线上两点(t_1，X_1)和(t_2，X_2)，利用式(1)计算得到适应性进化 n 代后菌体的比生长速率 $\mu(n)$。

7.6.3 计算菌体适应性进化的适合度

菌体适应性进化的适合度可由菌体比生长速率的增长率来表示，按式(2)计算：

$$R_\mu(n)=\frac{\mu(n)-\mu(0)}{\mu(0)}\times 100\% \qquad \cdots\cdots(2)$$

式中：

$R_\mu(n)$——传代培养第 n 代后菌体比生长速率的增长率；

$\mu(n)$ ——传代培养第 n 代后菌体的比生长速率；

$\mu(0)$ ——初始菌体的比生长速率。

8 结果分析

当传代培养第 n 代后菌体比生长速率 $\mu(n)$ 与初始菌体的比生长速率 $\mu(0)$ 相比，在统计学上具有显著性增长(置信区间为 95%)，认为此菌体在所采用的培养条件下实现了适应性进化。比生长速率增长率 $R_\mu(n)$ 越大，证明微生物适应性进化程度越高。