



清华大学 化学工程系
Department of Chemical Engineering, Tsinghua University



清华大学 深圳国际研究生院
Tsinghua Shenzhen International Graduate School

生物医药与健康工程研究院
Institute of Biopharmaceutical and Health Engineering (iBHE)

2021-2022春季学期新生研讨课前沿讲座
2022年4月11日

微生物育种工程技术与装备及其应用

邢新会

工业生物催化教育部重点实验室（清华大学），
清华大学化工系生物化工研究所，清华大学合成与系统生物学中心；
清华大学深圳国际研究生院生物医药与健康工程研究院（iBHE）

www.chemeng.tsinghua.edu.cn

Email: xhxing@tsinghua.edu.cn

生命系统的解析方法研究 一直在路上

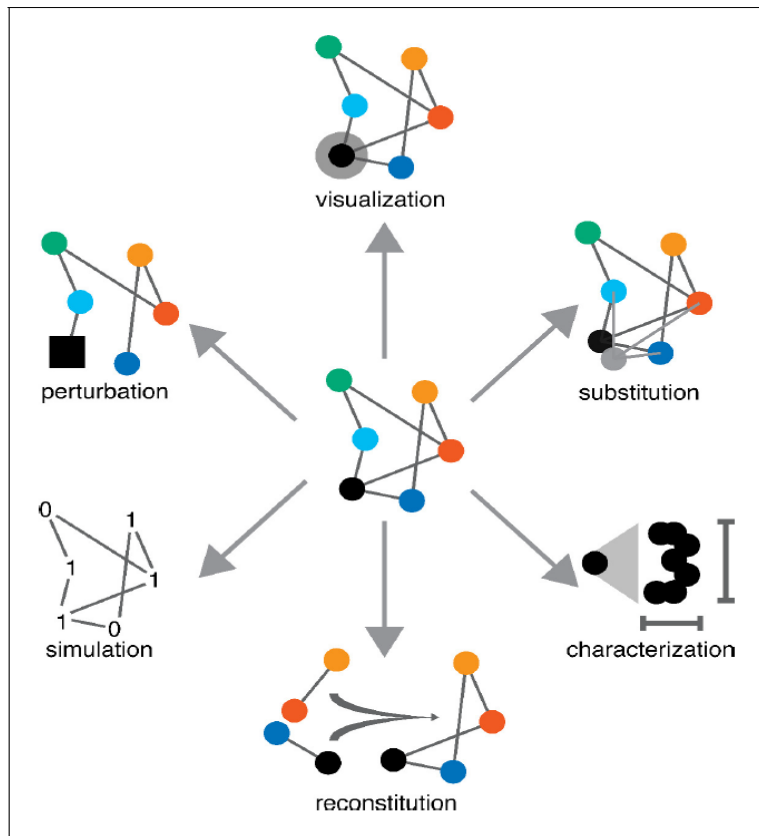


Figure 1. Six approaches for the analysis of living systems. In this schematic diagram, a living system is represented as an abstract network (center), with the colored nodes (circles) representing the different parts of the system, and the grey edges representing the interactions between the parts. Four of the six approaches described in this article involve doing something to one part of the system (shown here in black); the fifth approach involves combining multiple parts; and the sixth approach involves simulating some or all of the parts.

科研创新需要道器合一

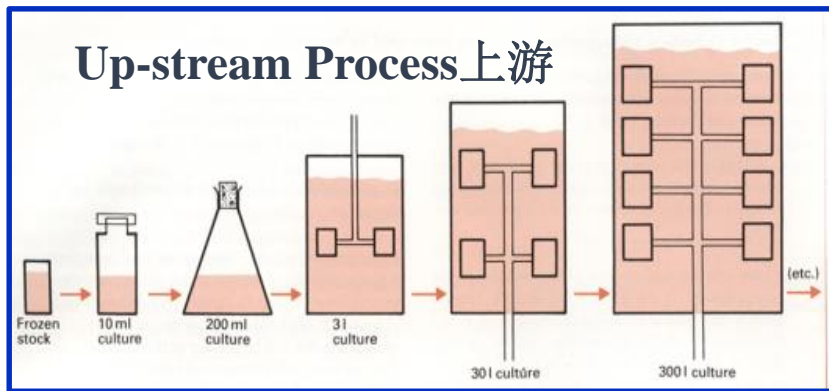


中国光学之父 王大珩
(1915年2月26日 - 2011年7月21日)

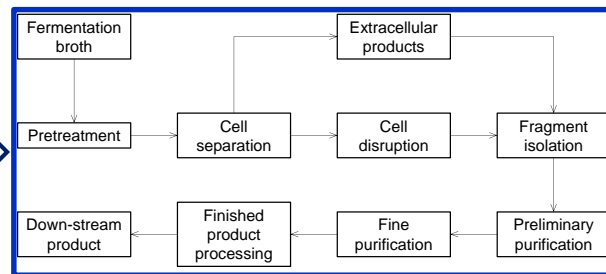
- 仪器仪表是工业生产的“倍增器”，科学研究的“先行官”，军事上的“战斗力”和社会生活中的“物化法官”
- 仪器仪表产业是国民经济和科学技术发展“卡脖子”的产业
- 科学技术是第一生产力，而现代仪器设备则是第一生产力的三大要素之一

优良菌种：绿色生物制造产业的核心

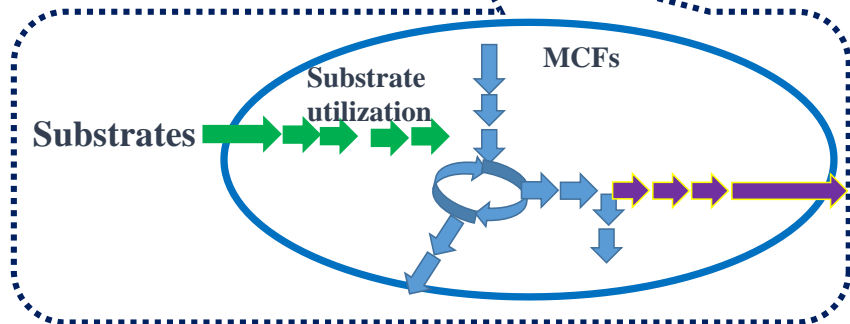
Medium
Biomass
C1 compounds
etc



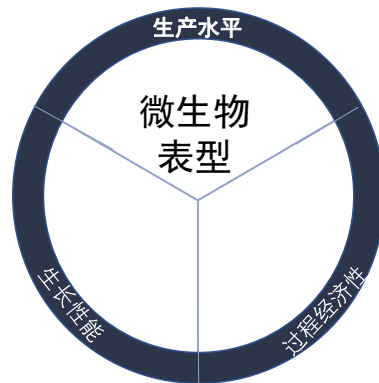
Down-stream Process 下游



Bioproducts



MCFs: Microbial Cell Factories
微生物细胞工厂



Ideal feedstocks
High production efficiency,
High tolerances,
Good economic performance,
Eco friendship and sustainability

菌种是我国绿色生物制造产业卡脖子环节

5000家： 生物制造规模以上企业

4000亿： 生物制造产业产值

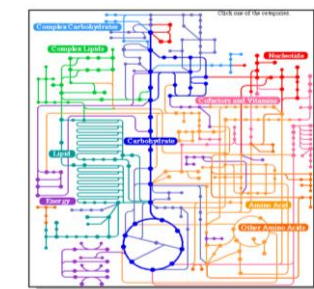
20%： 核心菌种知识产权占比

25%： 核心工业酶知识产权占比

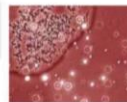
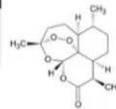
“无论是美国杜邦，还是丹麦诺维信，中国企业可买酶产品，但不可能买到菌种技术”

菌种选育是复杂的系统工程

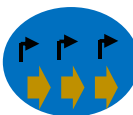
产量、产率、转化率



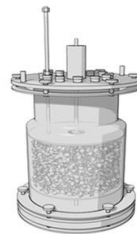
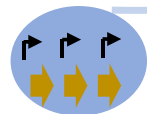
Target	Institutions	Time to market	R&D person years
1,3, propanediol	GENENCOR, ISLE, CHU POINT	15 years (1992-2007)	~575
artemisinin	AMVRS, CHU POINT	11 years (2000-2011)	~ 130
farnasene	AMVRS	4 years (2008-2012)	>250
isobutanol	CHU POINT, LXP, gevo	7 years (2005-2012)	TBD



工业应用



概念验证



时间

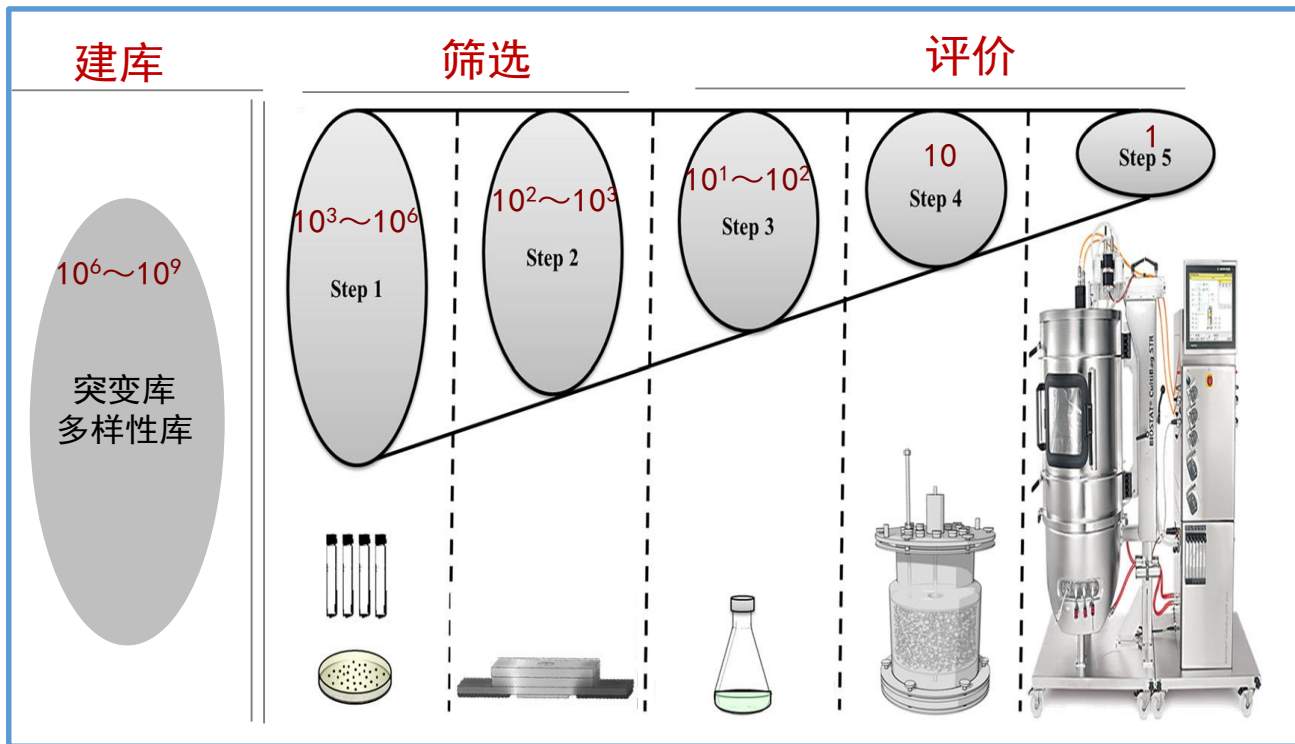
3-6 年 (>100 人年)

- Data from Zach Serber. Amvris
C. Eric Hodgman, Michael C. Jewett, Cell-free synthetic biology: Thinking outside the cell. Metabolic Engineering, 14 (2012) 261-269

随着实验量的增加，人力和时间不堪重负



生物育种：漫长复杂的流程作业

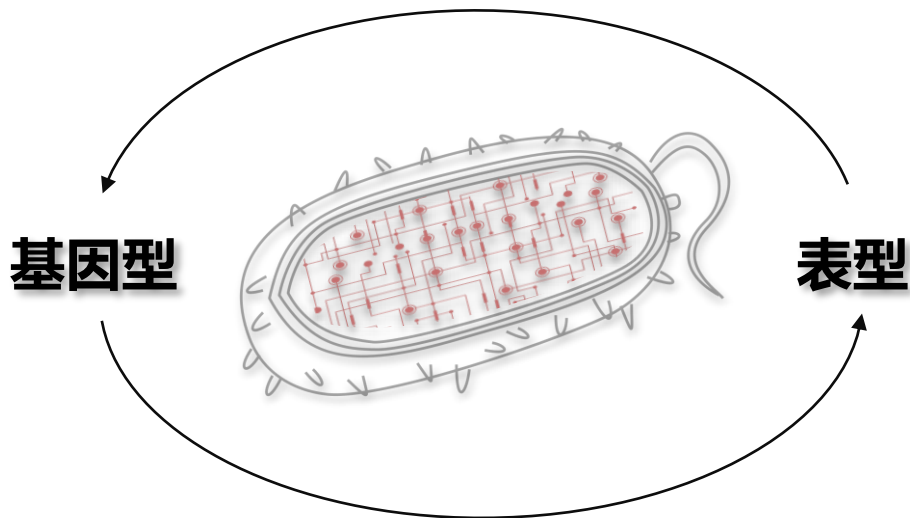


关键问题：生命暗物质

挑战：育种新技术与装备

智慧生物育种技术：理想表型的快速定制化创制

高通量关联位点挖掘



标准化工程改造

机遇：
基因测序及基因合成
高通量技术
系统生物学

系统生物育种方法：高效，快速，安全、智能、装备化

日益丰富的基因型挖掘构建和改造工具

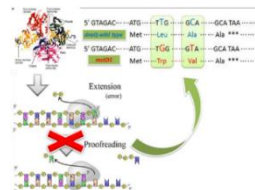
Chemical mutagenesis

UV radiation

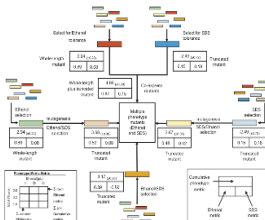
ARTP



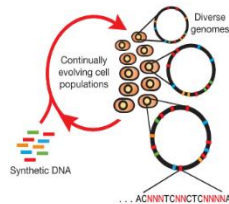
Biological mutator



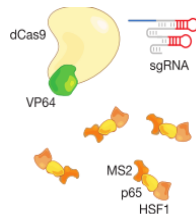
gTME



MAGE



CRISPR/Cas



Gene knockout

Error-prone PCR

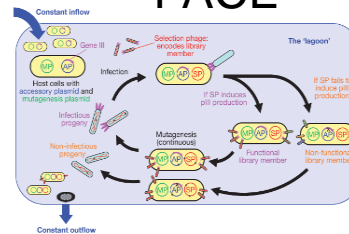
Promoter/RBS

engineering

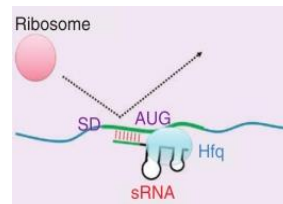
Non-natural gene expression

PFunkel

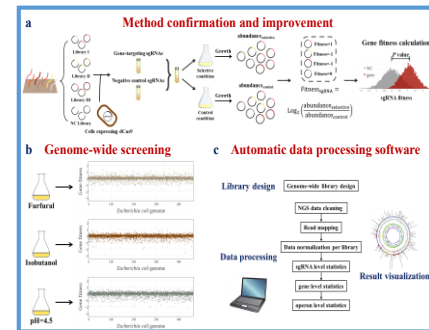
PACE



sRNAs



CRISPRi-pooled HT genomics



Metabolic Engineering. 2007, 9: 258–267

APL, 2008, 2009

Nature. 2011, 472: 499-503

Nature. 2009, 460: 894-898

Nature. 2014, 517: 583-588

PNAS. 1988, 85(21): 8126–8130

PLOS ONE. 2012, 7(12): e52031

PLOS ONE. 2013, 8(10): e77046

Science. 2014, 346 (6211): 1256272

Nature Protocols. 2011, 6(9): 1290-1307

Nature Biotechnology. 2013, 31(2): 170-174

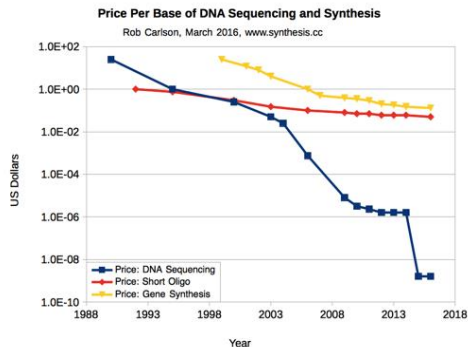
AMB, 2014, 2015

Nat Com, 2018

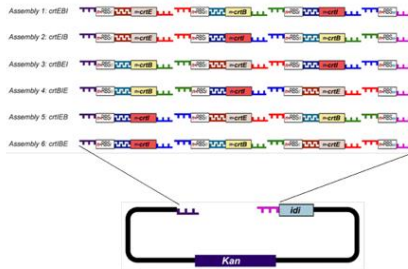
Nucleic Acid Res, 2018

基因型构建的能力呈指数爆炸增长，装备是核心支撑

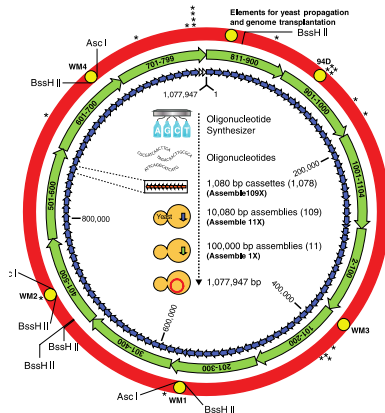
Gene Level



Pathway Level



Genome Level



装备是基因型构建技术
发展的重要支撑



Roche 454 Life
Sciences
(454 GS FLX)



Illumina MiSeq



Life Technologies
Ion S5



Pacific Biosciences
Sequel System



Oxford Nanopore
MinION



Life Technologies
Applied Biosystems
3900



ABI 3400



Beckman
Coulter 1000



Millipore
MilliGen/Biosearch
h 8800

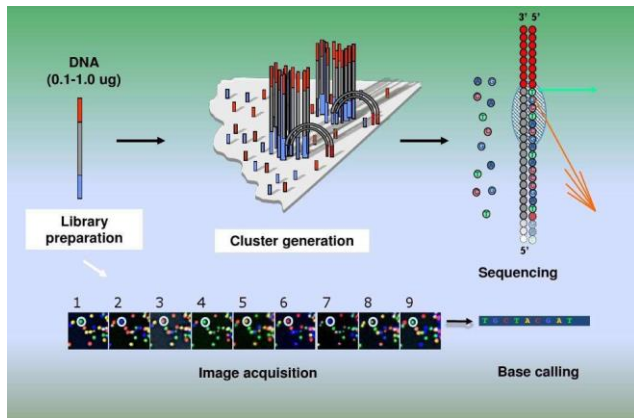


SGI-DNA BioXp
3200 DNA
workstation

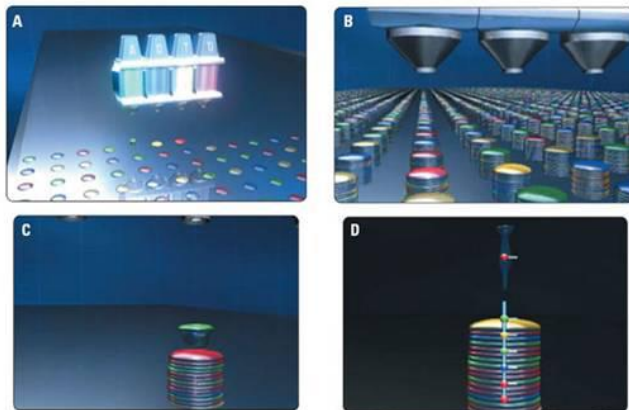
基因型构建能力提升核心是自动化、超并行 (massively parallel)



Illumina HiSeq 2000
二代测序芯片



Agilent SurePrint Technology
原位合成芯片

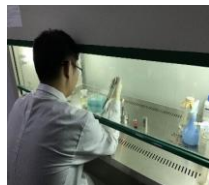


传统表型筛选/选择及表征效率低下

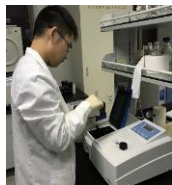
基于摇瓶的传统培养和传代操作极为繁琐



培养



取样



检测



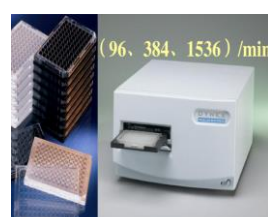
传代培养



化学因子梯度添加

通量？ 操作繁琐？ 平行性？

基于孔板的培养难以模拟真实环境、无法实现传代



溶氧？ 混合？ 成本？ 传代？

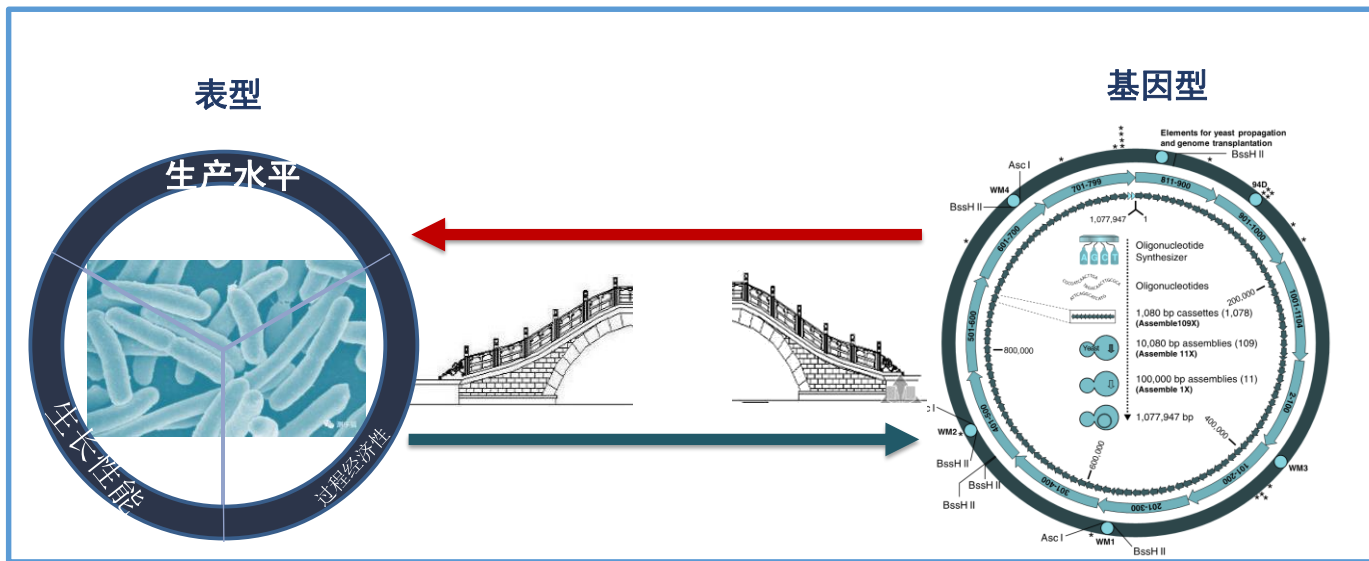
Labor-time-money consuming

迫切需要高效的表型测试技术

需要发展高通量微生物表型创制及表征技术



- ◆高通量基因组突变及功能基因发现和挖掘
◆高通量表型筛选及选择（进化）



清华致力于高通量生物育种技术与装备研制及其工业化

- ◆ 成功用于100余种各类微生物和动植物育种, 形成了生物育种装备新产业, 取得了显著经济和社会效益
- ◆ 组建了中国生物发酵产业协会微生物育种分会, 牵头制定生物育种国家标准
- ◆ 出口海外, 包括欧美、日本、新加坡、韩国和台湾等国家和地区, 成为高通量育种平台技术

牵头制定育种领域国家标准5项

GB	GB	GB	GB	GB
中华人民共和国国家标准	中华人民共和国国家标准	中华人民共和国国家标准	中华人民共和国国家标准	中华人民共和国国家标准
高通量微生物进化仪	高通量微生物进化仪	高通量微生物进化仪	高通量微生物进化仪	高通量微生物进化仪
高通量微生物进化仪	高通量微生物进化仪	高通量微生物进化仪	高通量微生物进化仪	高通量微生物进化仪
高通量微生物进化仪	高通量微生物进化仪	高通量微生物进化仪	高通量微生物进化仪	高通量微生物进化仪
高通量微生物进化仪	高通量微生物进化仪	高通量微生物进化仪	高通量微生物进化仪	高通量微生物进化仪

- 基金委重大仪器专项: “高通量微生物进化仪研制” (中期考核优秀)
- 基金委重点项目: “下一代谷氨酸棒状杆菌细胞工厂系统创制技术”
- 国家重点研发计划项目: “有机碳—人工合成细胞工厂”
- 国家质量基础NQI重点专项课题: 生物育种5项国家标准
- 中国专利优秀奖
- 第45届日内瓦国际发明展金奖
- 国轻工业联合会技术发明一等奖



MMC系列
(微液滴微生物培养)



DREM-CELL
(微液滴单细胞高通量筛选)



基于微流控的全自动高通量进化培养与筛选

在线自动化菌种评价系统

动植物
诱变育种仪



ARTP-P



ARTP-A

诱变育种

微生物
诱变育种仪



ARTP-M



ARTP-IIS



ARTP-III



ARTP-IIIS



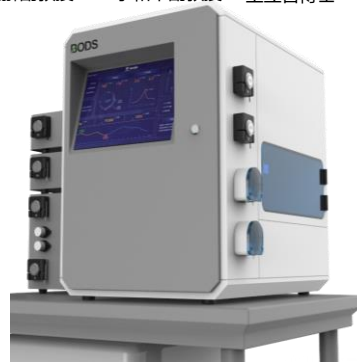
张翀副教授



李和平副教授



王立言博士



BODS-B

合作单位: 天木生物

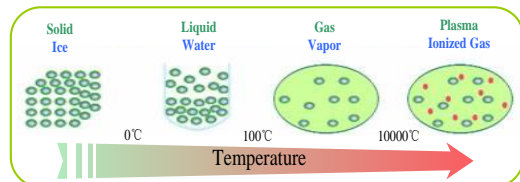


常压室温等离子体（ARTP）诱变育种技术研究

等离子体？

ARTP: Atmospheric and Room Temperature Plasma

Plasma: High-energy Matters

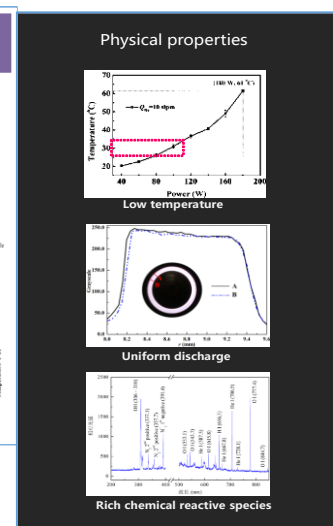
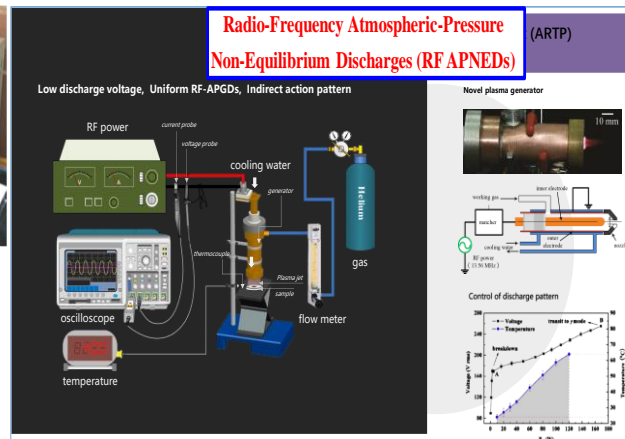
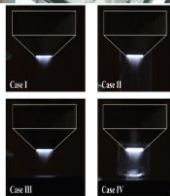
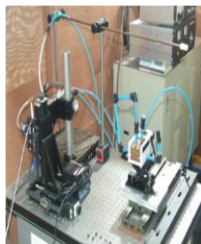


➤ **Nonthermal plasmas (cold plasma, low temperature)**

**Radio-Frequency Atmospheric-Pressure
Non-Equilibrium Discharges (RF APNEDs)**

Atmospheric pressure and room temperature (20-40°C)

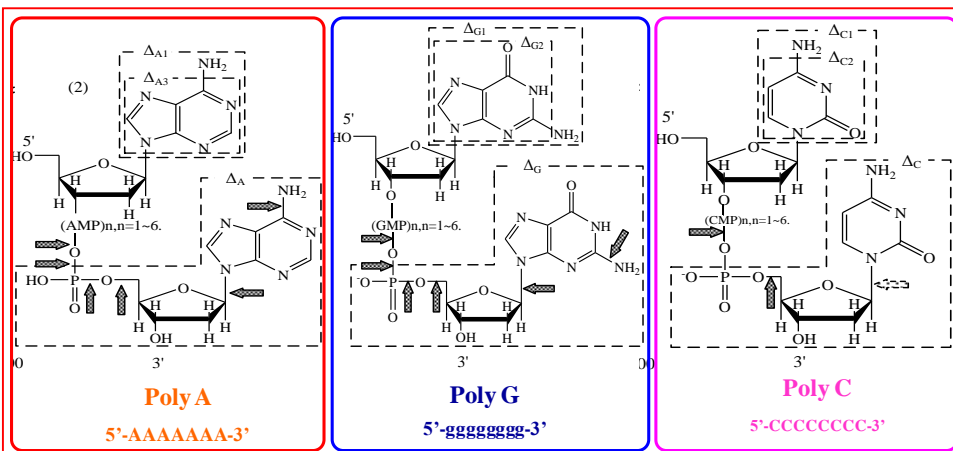
Atmospheric and **R**oom **T**emperature **P**lasma (ARTP) for
biotechnology applications



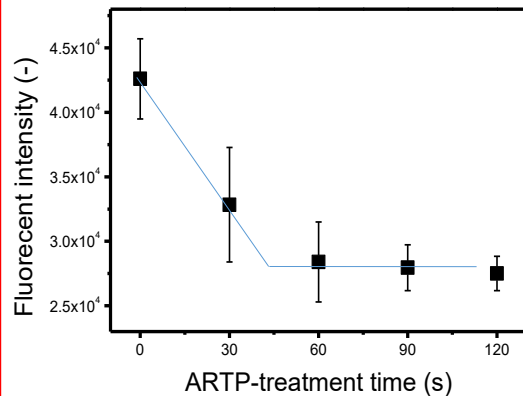
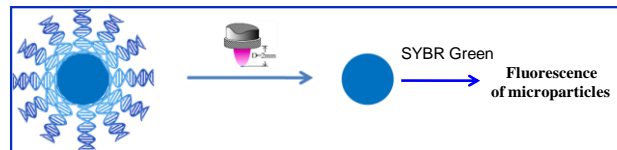
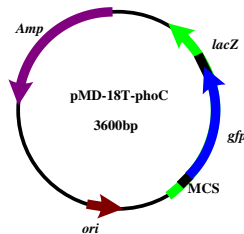
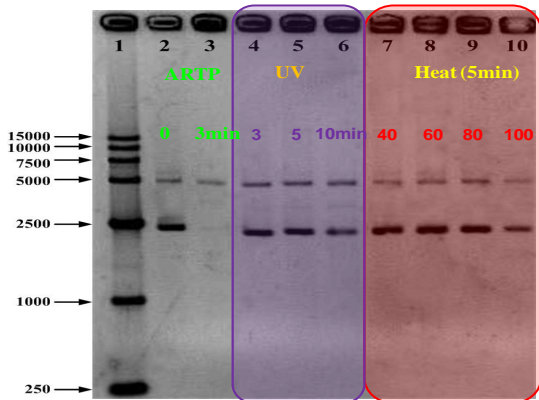
APPLIED PHYSICS LETTERS, 2006; APPLIED PHYSICS LETTERS, 2006; PLASMA SOURCES SCIENCE & TECHNOLOGY, 2007; APPLIED PHYSICS LETTERS, 2008; Journal of Physics D: Applied Physics, 2008; Plasma Chemistry and Plasma Processing, 2007; Applied Physics Letters, 2009; Journal of Applied Physics, 2010; IEEE TRANSACTIONS ON PLASMA SCIENCE, 2012; PLoS ONE, 2013; CHN J of Chemical Engineering, 2014; AMB, 2014, 2015; JBB, 2015; 生物产业技术, 2017, 2019; Tsinghua PhD Thesis (2015, 2017); Biotech J, 2018; BMC Genomics, 2019; Scientific Reports, 2020; CHN J of Chemical Engineering, 2021; 化工学报, 2022

ARTP诱变的分子机制及过程

可以断裂的
碱基集团

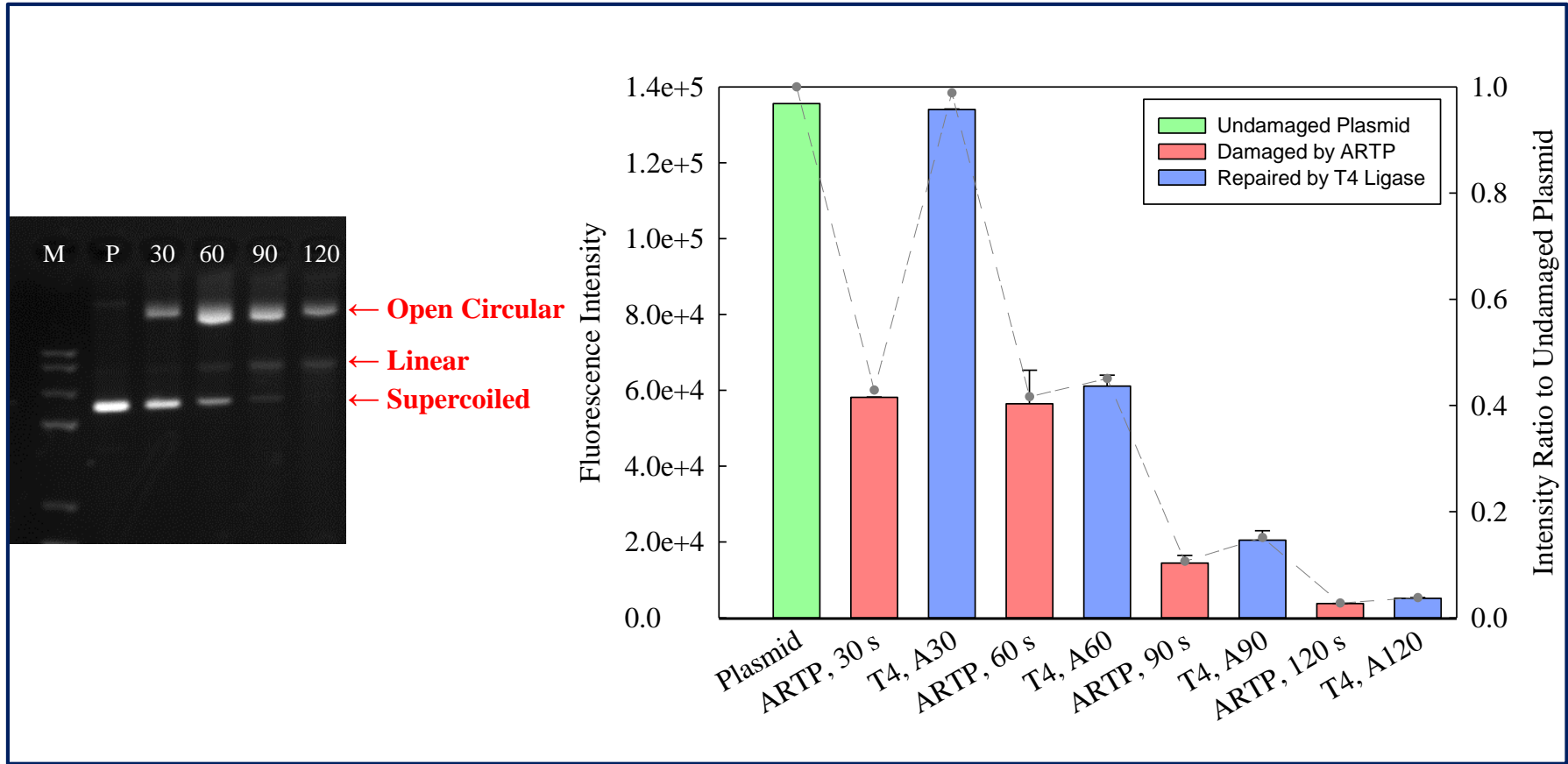


ARTP可以快速的
直接断裂质粒



双链合成DNA
随ARTP处理的断裂过程

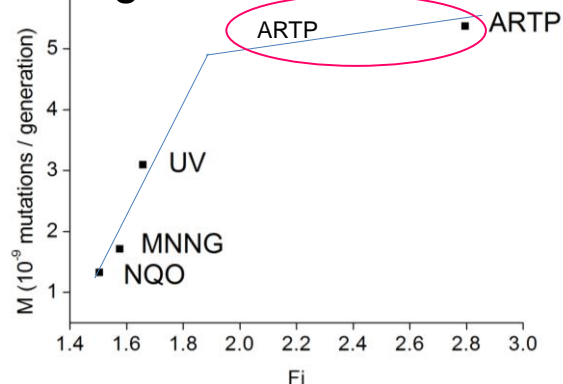
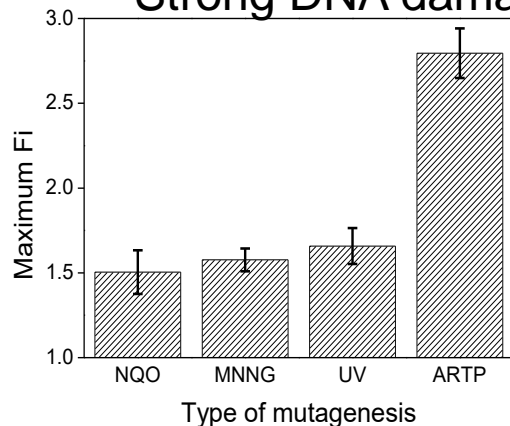
Proof for Double Strand Breakage of DNA by ARTP



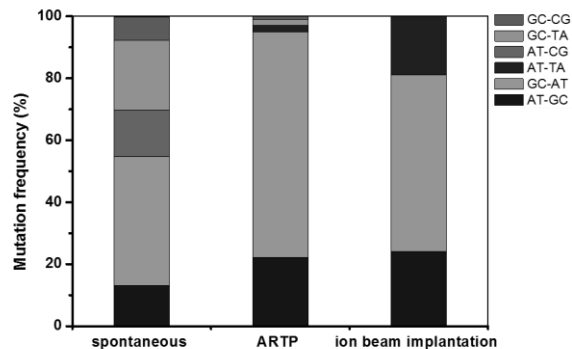
• 22°C, 1 hr. ; 65 °C, 10 min. ; 4 °C, —

ARTP诱变的生物学效应

Strong DNA damage vs high mutation rate



Xue Zhang et al., AMB (2015)



More GC-AT transition
Tsinghua PhD Thesis (2015)

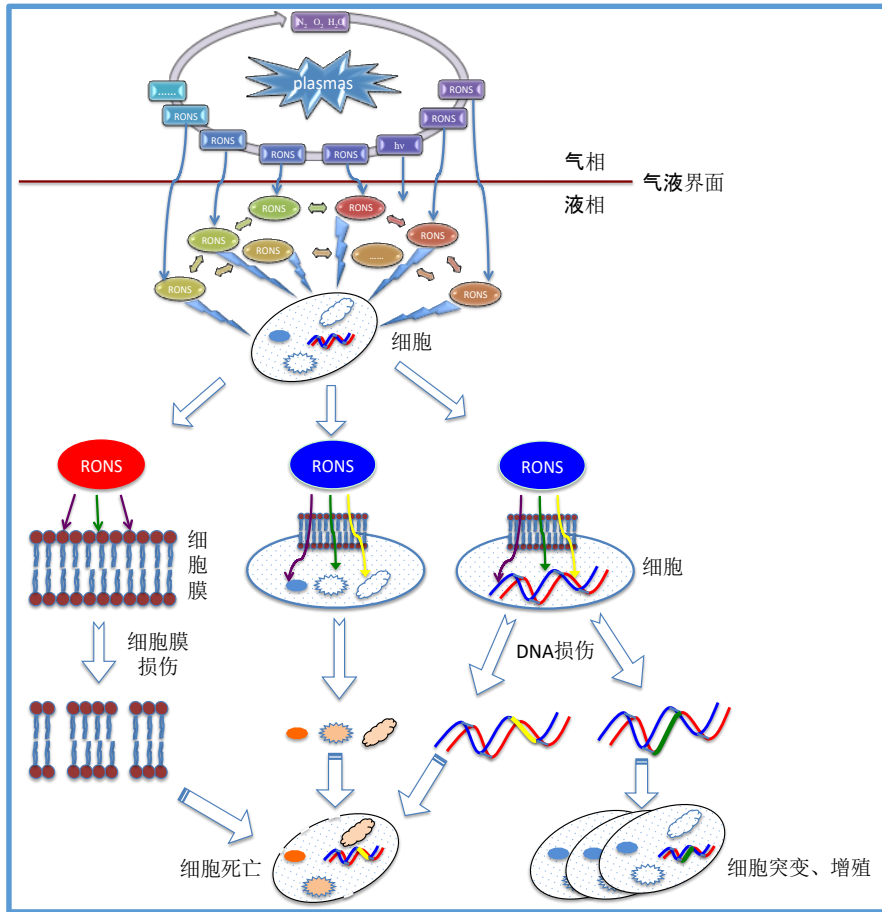
不同螺旋藻株多糖含量(w/w,%) 稳定性(每代培养: 2周)

螺旋藻株	传代次数	11	15	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

High genetic stability

ARTP诱变育种的可能机制



原核生物主要修复机制

SOS genes

Functions

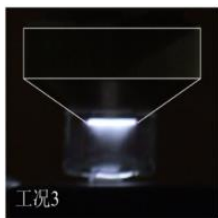
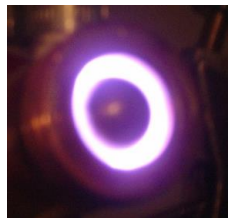
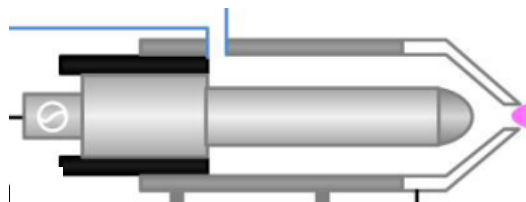
- *recA* Modification of repressor protein, Recombination, SOS mutagenesis
- *lexA* SOS repressor
- *uvrA, B, C* Excision repair
- *polB* DNA polymerase II
- *umuD, C* SOS mutagenesis, DNA polymerase V
- *sutA* Inhibition of membrane formation
- *dinB* Non-target mutagenesis, polymerase IV
- *dinI* Inhibition of RecA protease activity

真核生物主要修复机制

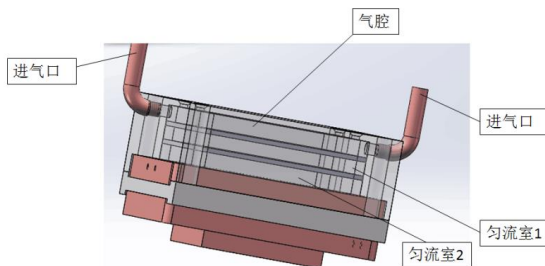
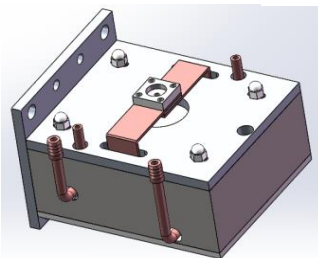
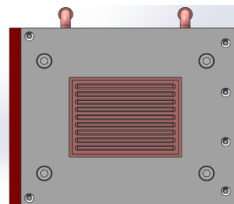
Repair of double strand breakage

化工进展 (2016)

ARTP 诱变仪：从实验室到原型机到产业化 (2005-2014-2018)



For microbial mutagenesis:
irradiation area less than 8mm
(210mm²), for 10 μ l culture



For plants and animals mutagenesis:
irradiation area $> 5900\text{mm}^2$

王立言博士
(2009年清华博士毕业)

Dr. N Ge

Dr. G. Li

Dr. PS. Le

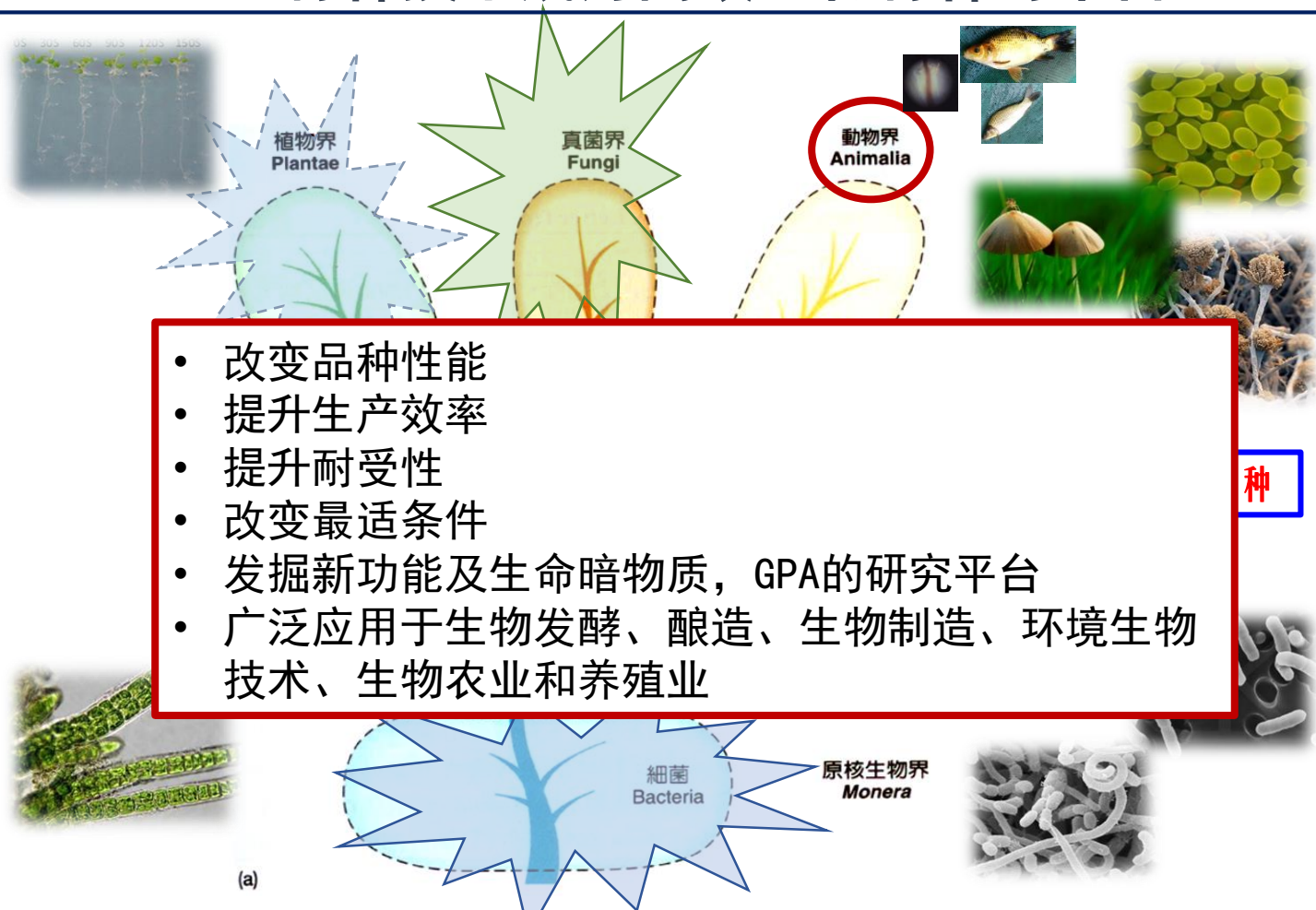
Dr. C Zhang

Dr. LH Jin

Dr. MY Fang

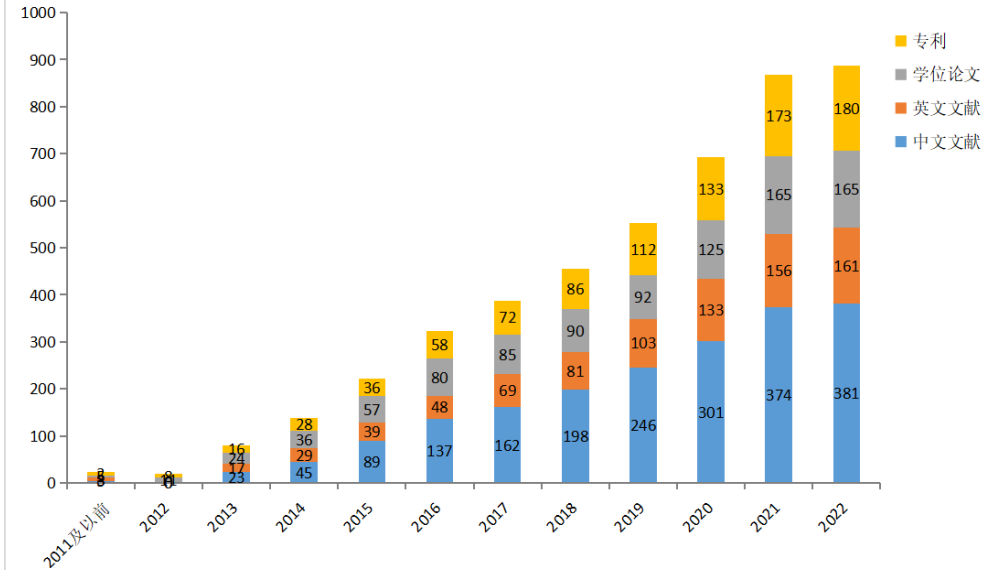
Dr. X Zhang

ARTP 育种技术成为高效生物育种的平台

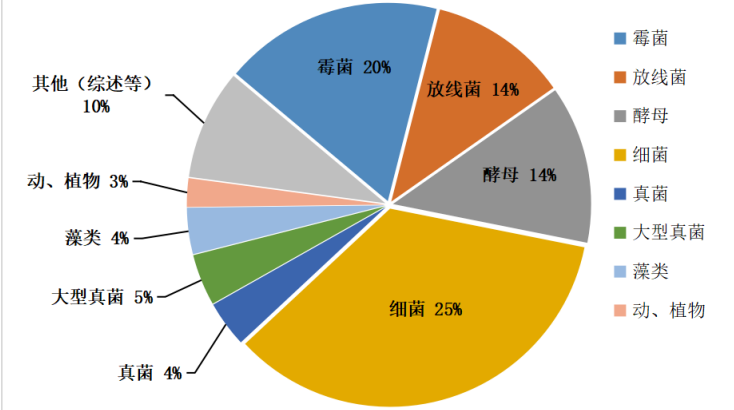


建立了以ARTP诱变为核心的生物育种技术研究和应用新领域

ARTP逐年案例数量

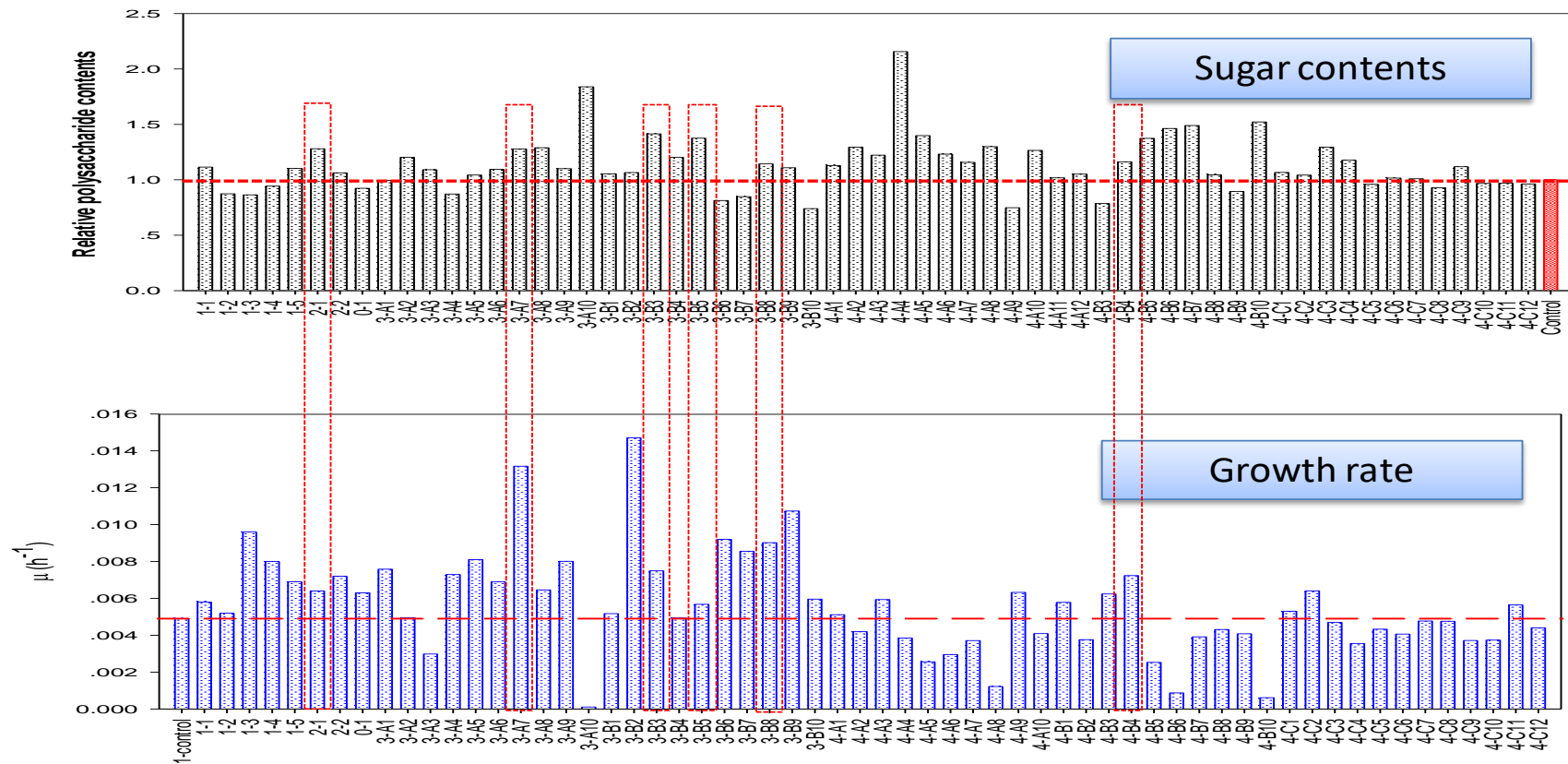


ARTP发表文章案例分类图

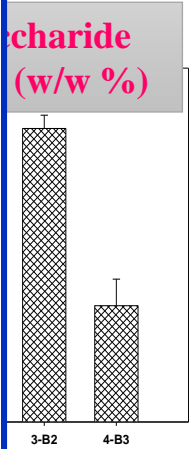
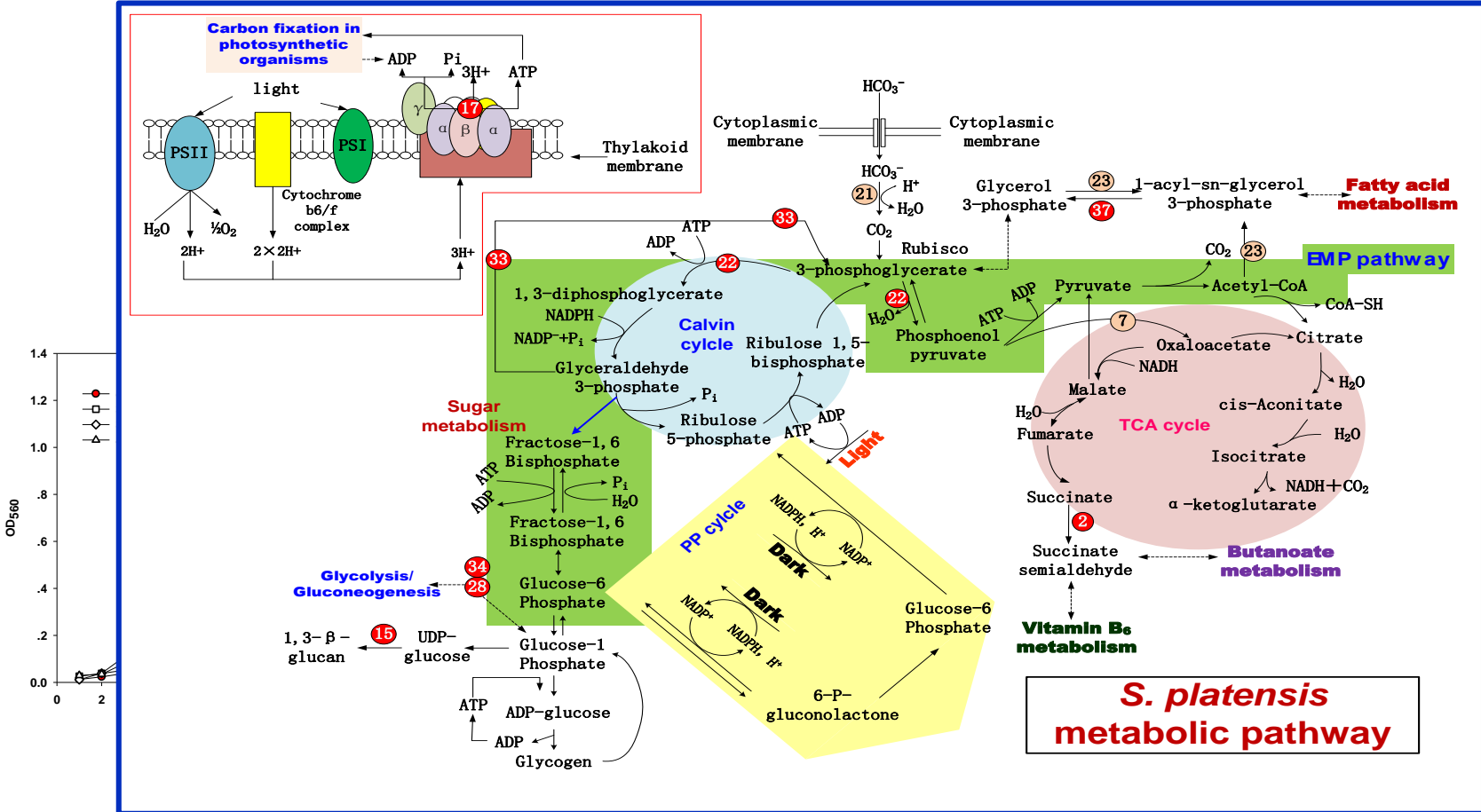


牵头组建了中国生物发酵产业协会微生物育种分会，在全国各地轮流举办系列生物育种技术暨高通量筛选理论与应用研讨会，至今已举办8届，并建立了为生物产业提供育种服务的新机制，在学术界和行业产生了重要影响力。

代表性应用案例：ARTP诱变育种提高微生物产率



代表性突变株的组学分析



***S. platensis* metabolic pathway**

高产氨基酸菌株构建新方法

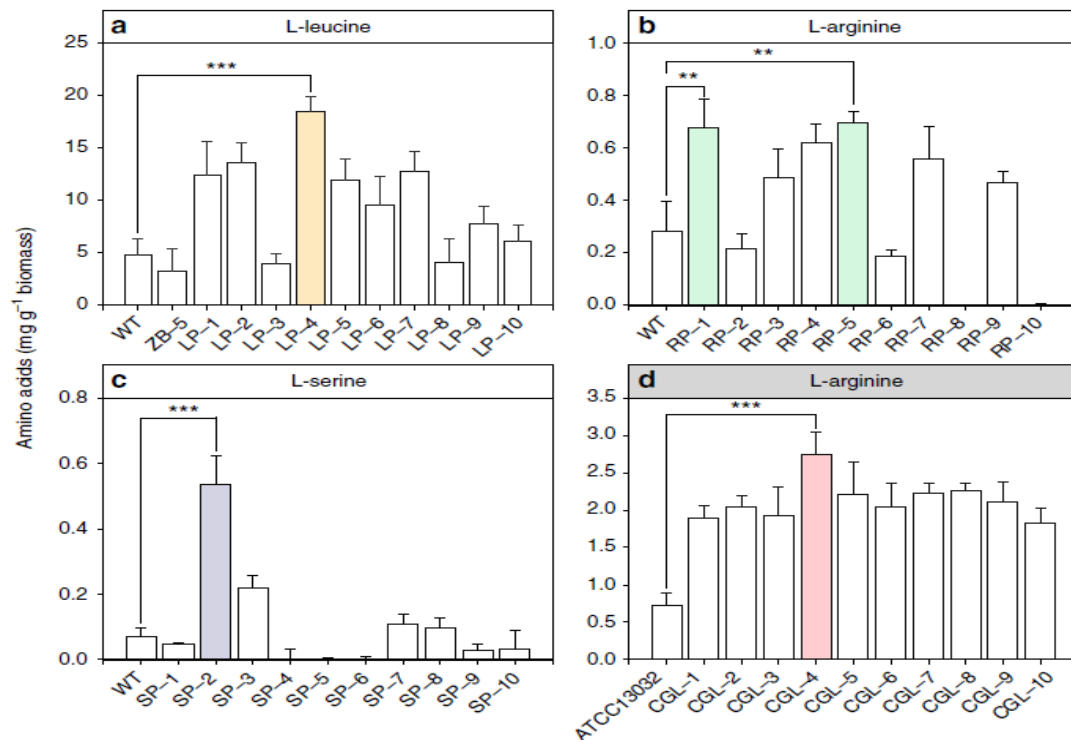
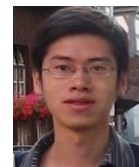


Fig. 5 The amino acids produced by the wild-type and the mutated strains. **a** L-leucine productions of *E. coli* mutants selected by the leucine rare codon-rich *kan^R*. **b** L-arginine productions of *E. coli* mutants selected by the arginine rare codon-rich *kan^R*. **c** L-serine productions of *E. coli* mutants selected by the serine rare codon-rich *spec^R*. **d** L-arginine productions of *C. glutamicum* mutants selected by the arginine rare codon-rich *kan^R*. Values and error bars represent the mean and the s.d. ($n = 3$). ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ as determined by two-tailed *t* test

面向表型测试的高通量进化与分选工程

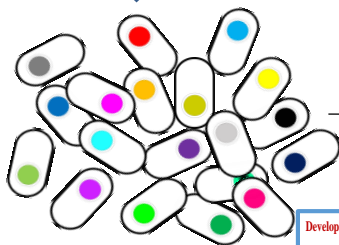


张翀副教授



王立言博士

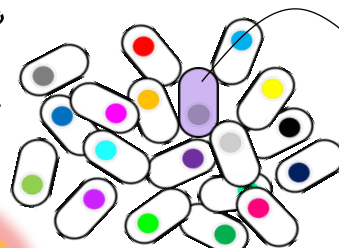
- **CRISPER**
- **Mutagenesis**



Generation of genotypes

Fluorescence
signal

Phenotyping
Biosensor/
Signal



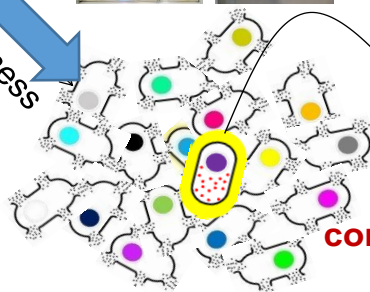
Screening

by **FACS**, plates, HTP, **Microfluidics**
assay etc

discrete evolution



fitness

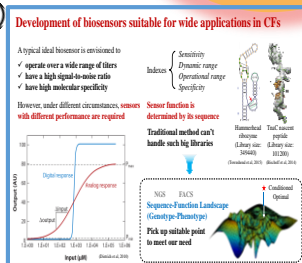


Selection

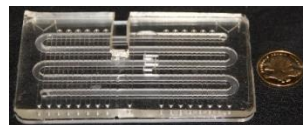
by fitness

continuous evolution

Adaptive lab evolution (ALE):
Long time, labor extensive,
high cost, large amount medium,
low throughput, no automatic
instrument



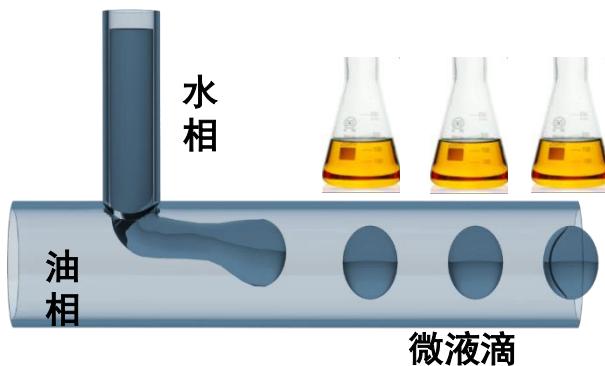
Appl Microbial Biotech (2015)
Metabolic Eng (2016, 2017)
ACS Synthetic Biology (2017)
Nature Communications (2018)
Nat Chem Biology (2020)
Scientific Reports (2020)
Nucleic acid Research (2018, 2021)
Trends in Biotech (2021)



Microdroplet can be controlled
as a individual microcultivator

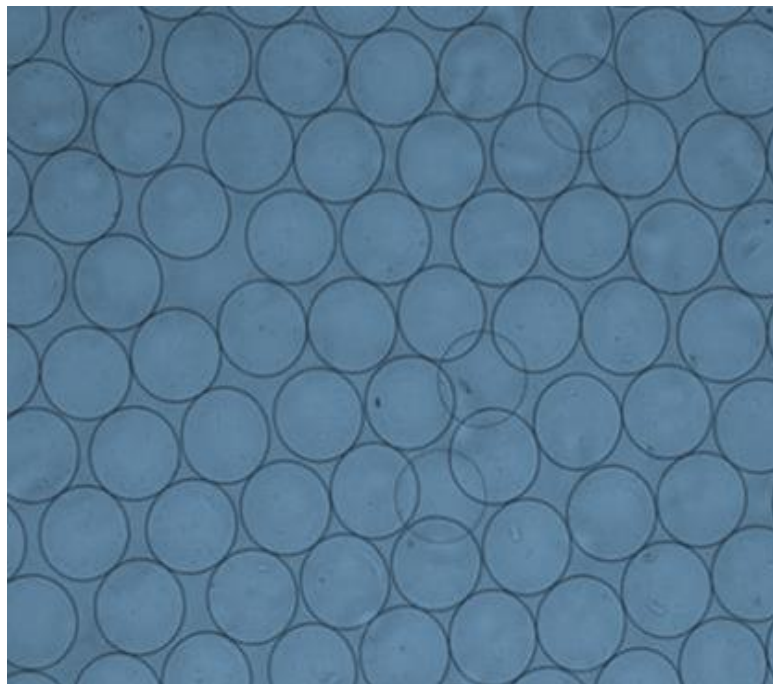
Automated and HT Microdroplet Microbial Culture (MMC) System

微液滴是自动化、超平行微生物培养的关键技术



微液滴特点：

- 独立的微反应器、减少交叉污染
- 微生物包裹，内容物无泄漏
- 比表面积大，质能交换快
- 液滴操作自动化，平行性高
- 数据质量高，分析精确
- 容易实现高通量表型测试

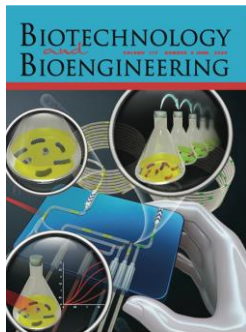


基于液滴微流控技术自动化高通量筛选及进化技术与装备创制

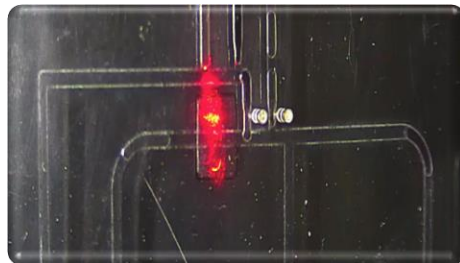
挑战:

- 自动接种-培养-传代的实现
- 快速在线监测（细胞浓度、代谢产物）
- 液滴通量调控
- 高稳定性运行
- 选择压力施加
- 培养条件控制
- 定制化操作
- 系统集成及装备化

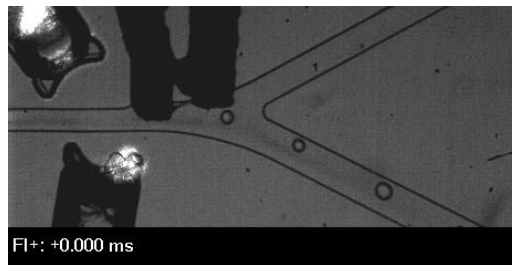
实验室研究到产业化装备研发：5年历程
未发表论文



高通量单细胞微滴培养系统 (μL , $10^2 \sim 10^5$ 通量)



单细胞液滴超高通量分选系统 (pL , $10^5 \sim 10^7$ 通量)



中科院微生物所杜文斌博士、上海交大冯雁-杨广宇博士合作

国际首创自动化高通量微生物微液滴（MMC）培养仪

通量高、平行性好

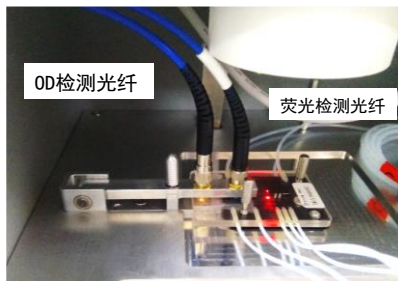
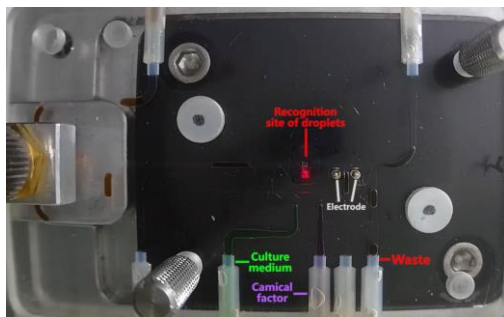
在线检测生长状态

自动化、智能化、操作灵活友好

梯度化学因子自动添加

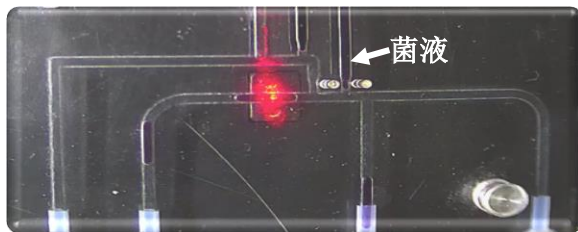
MMC：多用途设备平台

- 长期连续适应性进化（底物利用、环境耐受（化学、物理）、产率提升等
- 微生物生长曲线测定
- 多因素多水平微生物培养条件优化（响应面）
- 耐药机理研究（eg 测定抗菌药物最低抑菌浓度（MIC））
- 底物 / 产物偶联性光谱检测
- 微生物培养组（Culturomics）及微生物菌群（Microbiome）

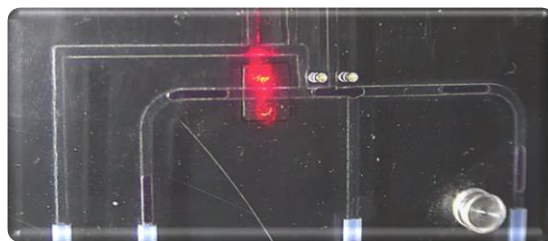


主机型号	MMC-B2
样品通量	0~200个微滴培养单元
可见光谱检测	全波段：350~800nm OD大量程：0-15，全生长状态监测
荧光检测	多色激光选配
检测方式	无需取样、在线检测 OD和荧光可同时检测
微滴体积	2-3 μ L
全温度控制	25-40 $^{\circ}$ C， \pm 0.5 $^{\circ}$ C
自动化	传代、检测、因素梯度、分选
智能化	依据OD值智能筛选或选择性筛选
可连续运行	运行时间长达30d 传代次数高达100次

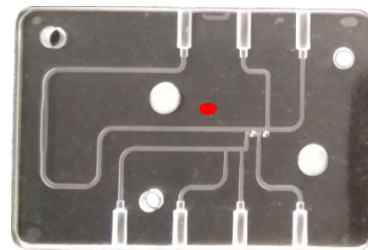
MMC自动化操作过程案例



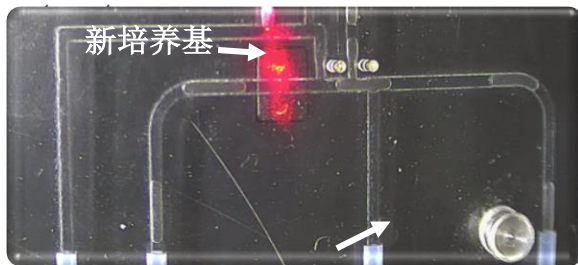
Microdroplet formation-



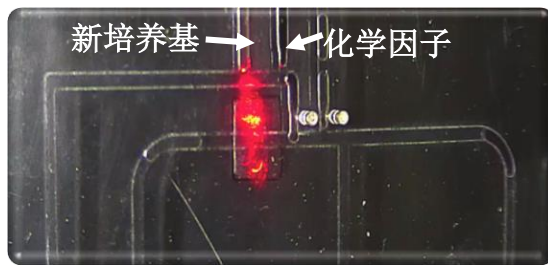
Repeated movement-culture



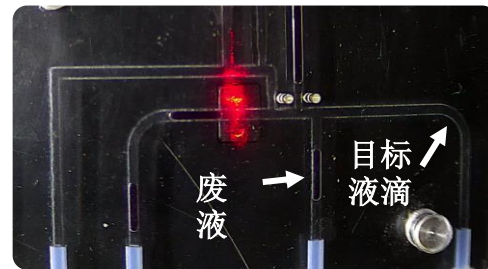
Online OD detection



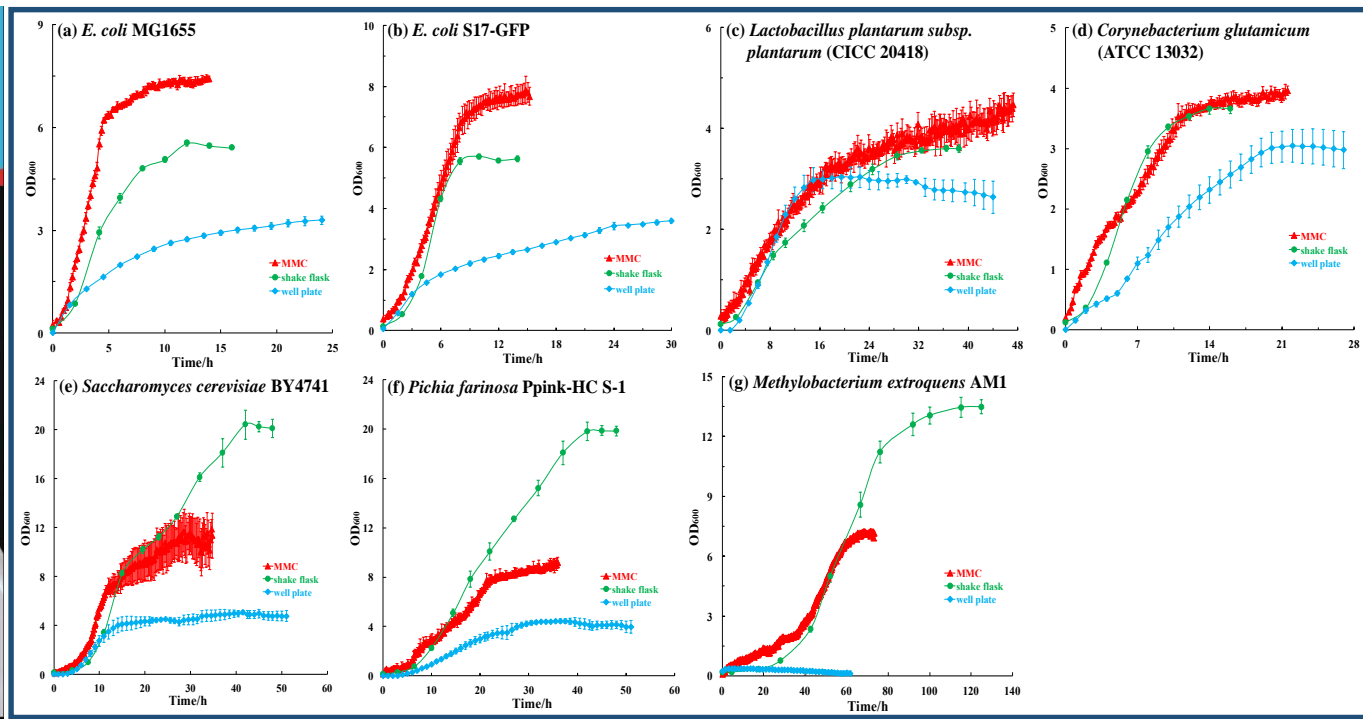
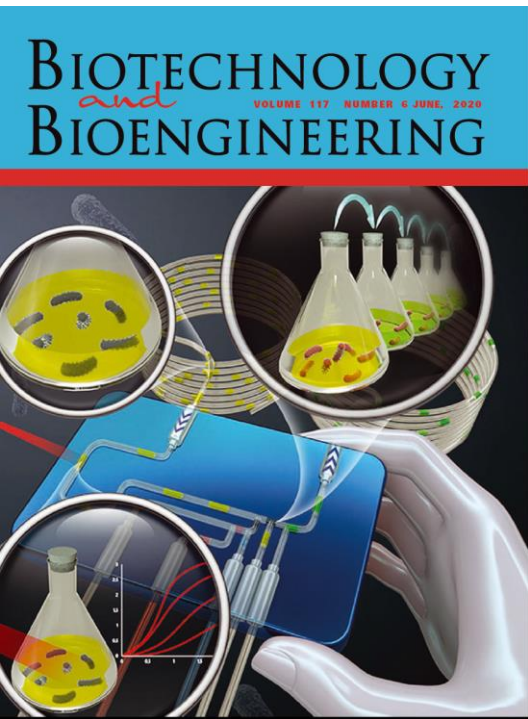
Microdroplet separating & fusion—
subculture



Auto addition of gradient chemical factors



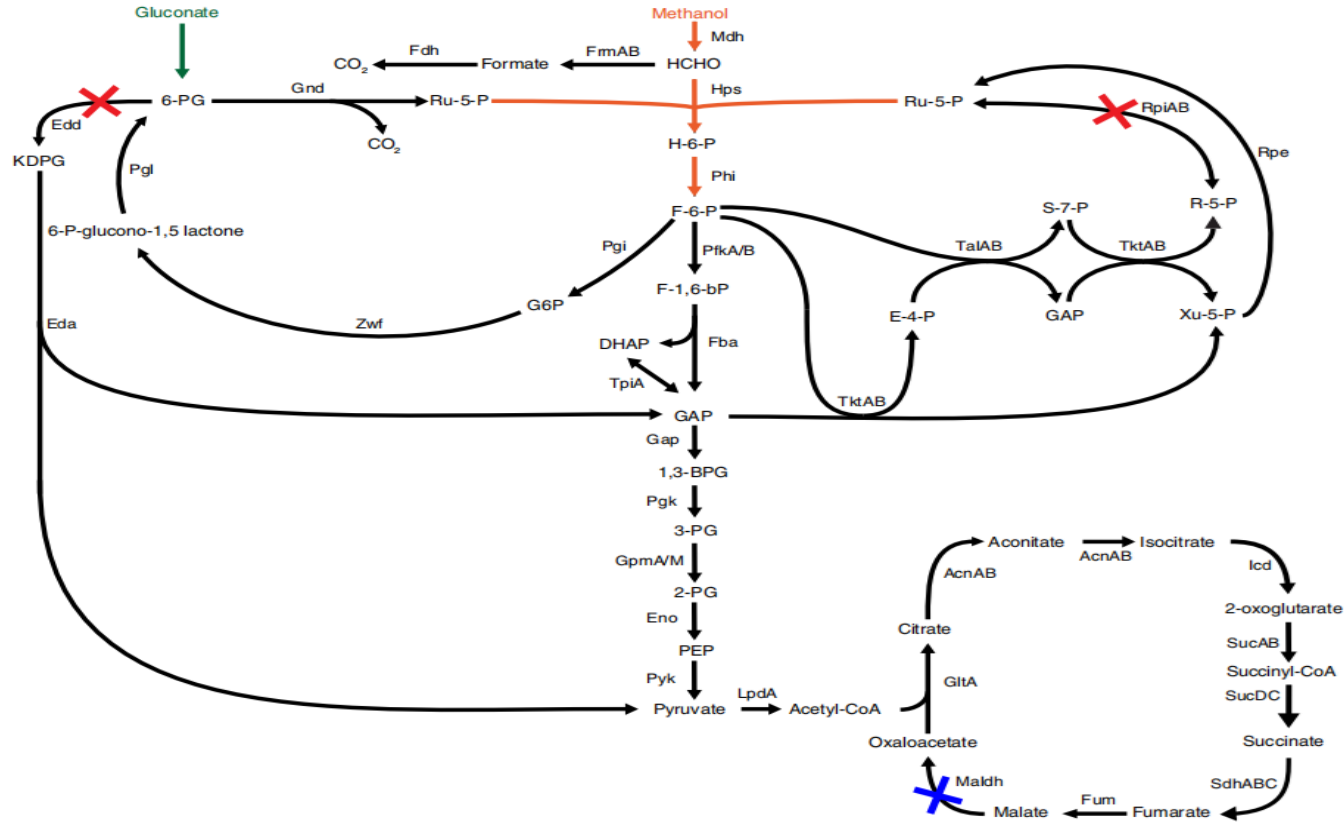
Microdroplet sorting



Biotechnology and Bioengineering, **117** (6), 1724-1737(2020) Featured Cover

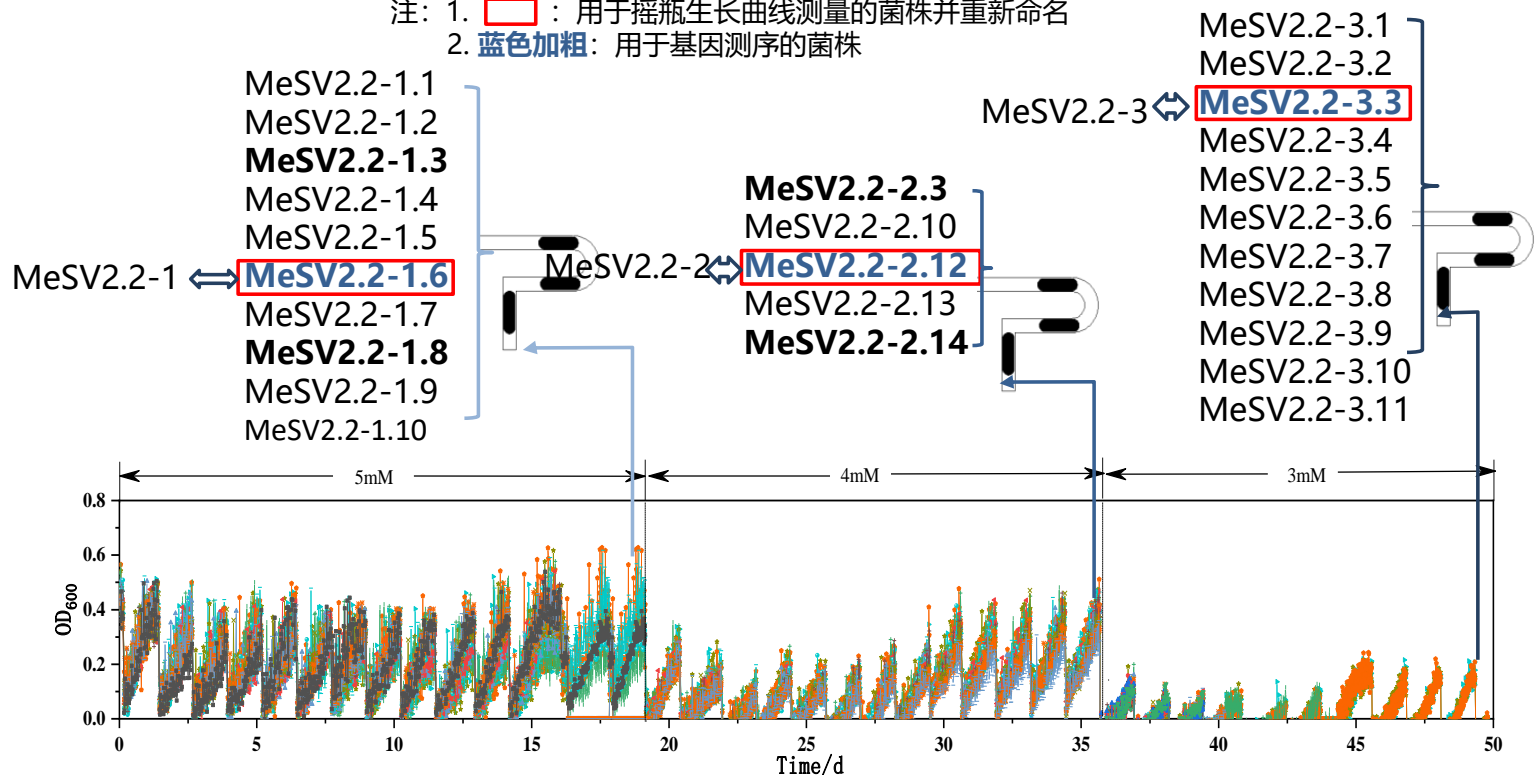
甲醇利用型*E. coli* 适应性进化

Collaborating with Prof. Julia A. Vorholt (ETH Zurich)



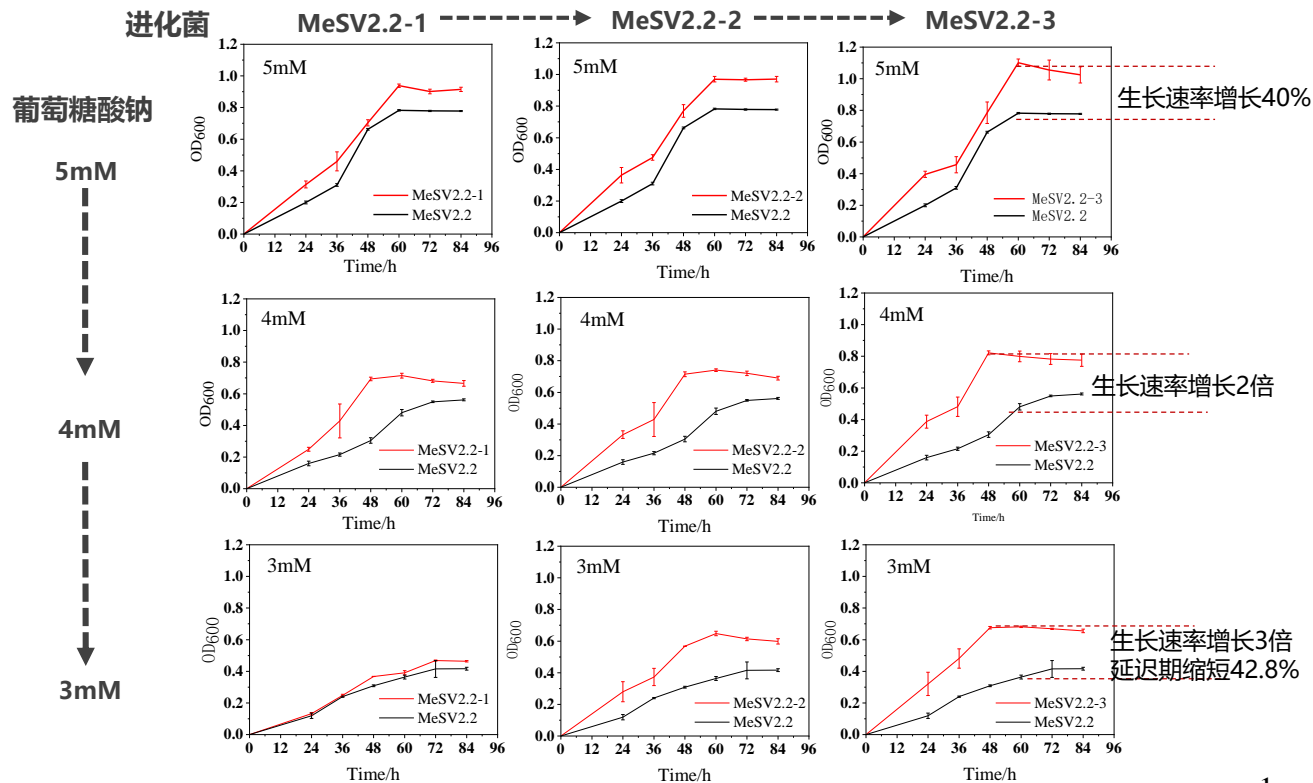
利用MMC实现*E. coli* Me SV2.2 自动化高通量连续进化

注：1. ：用于摇瓶生长曲线测量的菌株并重新命名
2. 蓝色加粗：用于基因测序的菌株



大肠杆菌 MeSV2.2 在不同浓度葡萄糖酸钠下的连续进化曲线

摇瓶培养评价进化菌株的生长特性



大肠杆菌 *MeSV2.2* 及其进化株在不同浓度葡萄糖酸钠下的摇瓶生长曲线

进化菌株的比较基因组分析

□ 与甲醇代谢途径有关的突变基因

✓ 影响NAD⁺/NADH比例的基因nadR

✓ 与RuMP途径中甲醇利用有关的基因突变 $frmA$ 、 $pckA$

✓ 葡萄糖酸钠代谢有关的突变基因 $gntR$ 、 edd 、 $gntU$ 、 $idnT$

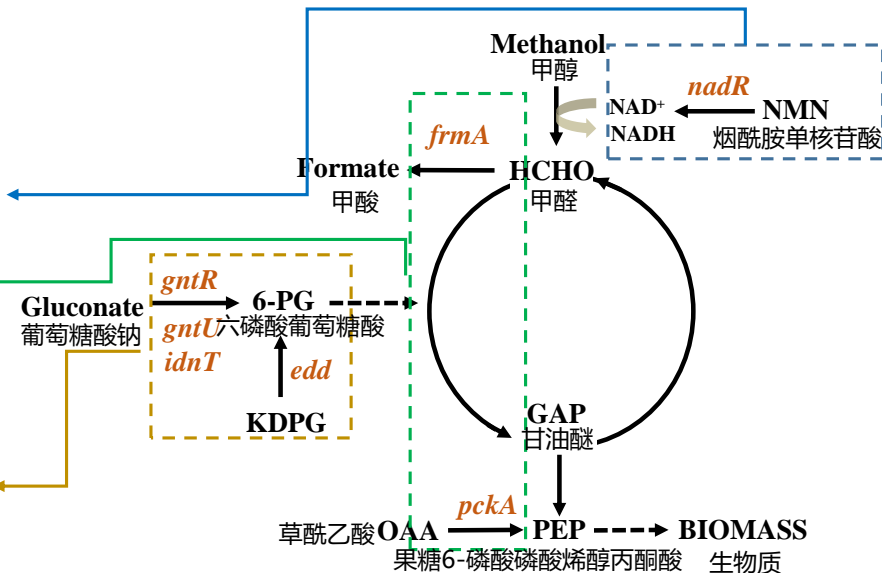


图4-2.突变基因中与甲醇代谢有关基因

$gntR$: DNA结合转录阻遏物; $frmA$: 谷胱甘肽依赖性甲醛脱氢酶;
 $nadR$: 烟酰胺单核苷酸腺苷酸转移酶; $gntU$: 低亲和力葡萄糖酸盐转运蛋白; $idnT$: Gnt-II系统L-氨基酸盐转运蛋白; edd : 磷酸葡萄糖酸盐脱水酶; $pckA$: 磷酸烯醇丙酮酸羧激酶

ARTP诱变与MMC进化结合选育几丁质脱乙酰基酶高产菌株

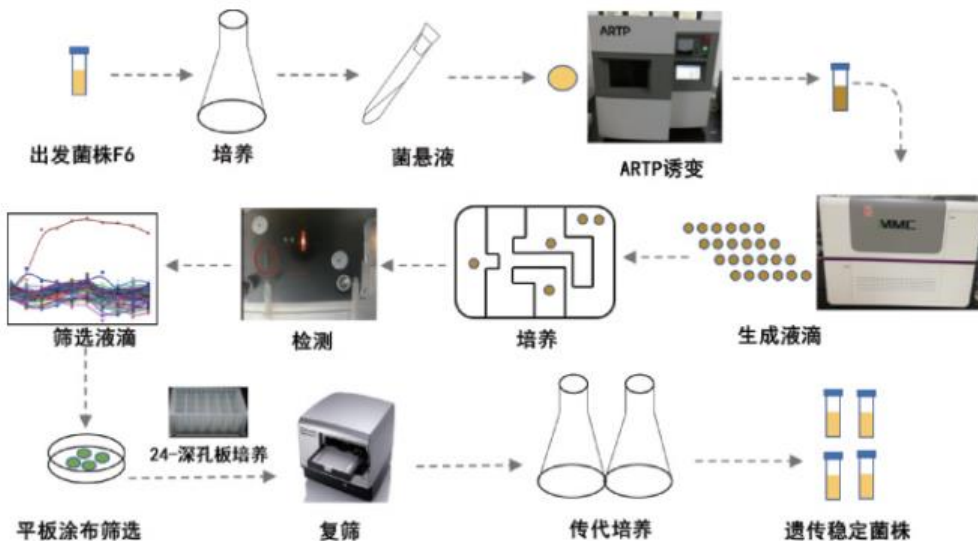


图1 常压室温等离子+微流控对高产ReCDA菌株的诱变选育流程

- 通过600nm、400nm两个波段同时对细菌生长量(OD)和酶活性(显色反应)进行检测

天津科技大学, 王敏教授课题组, 中国酿造, 2020

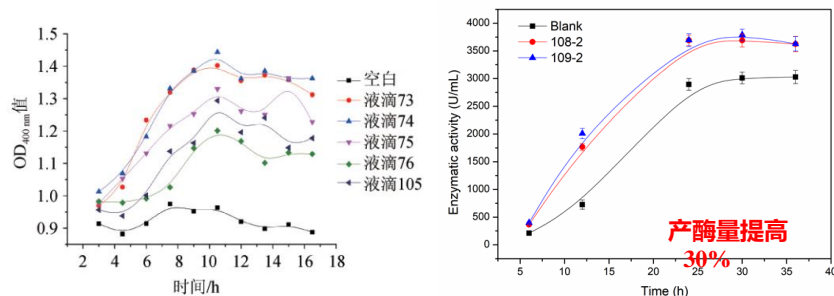


图3 马红球菌CGMCC14861的微生物液滴培养结果

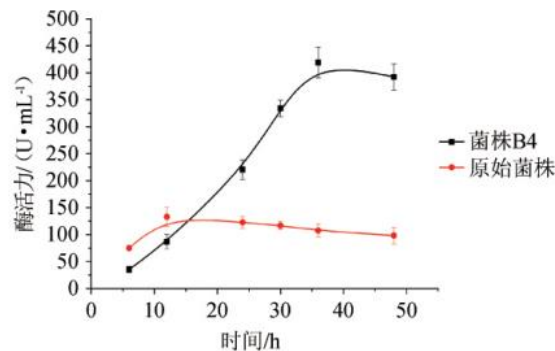
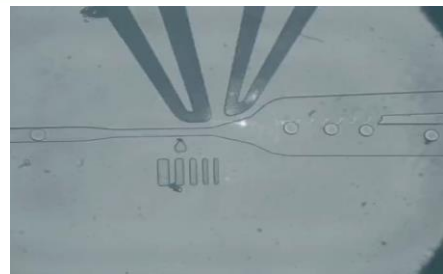
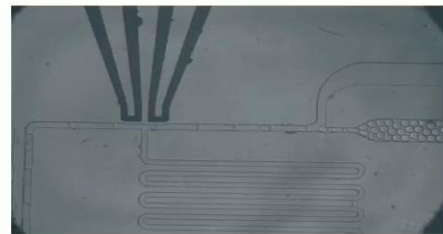
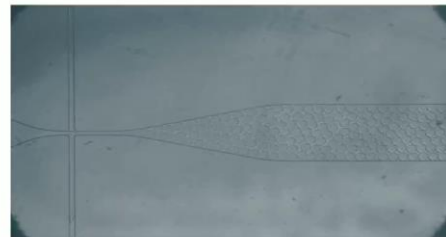
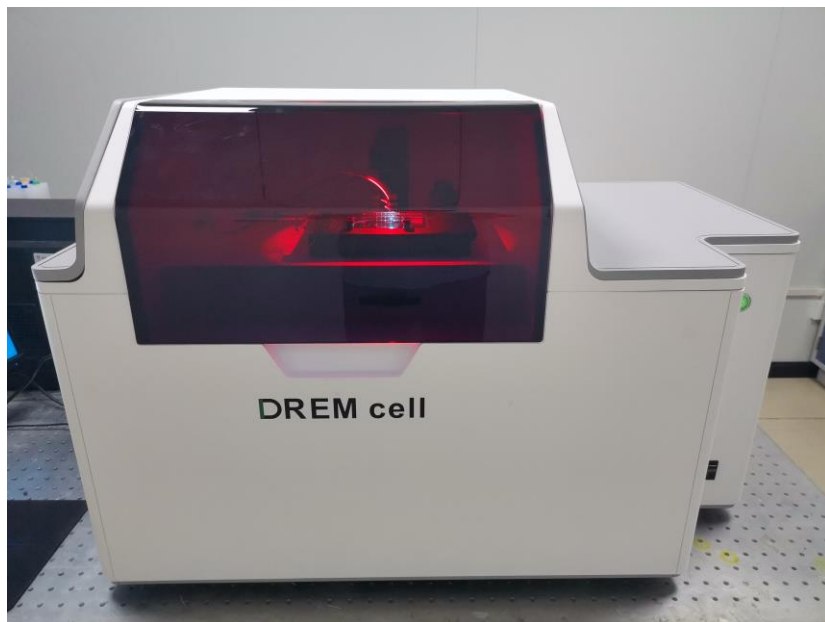


图5 菌株B4摇瓶培养产几丁质脱乙酰基酶曲线

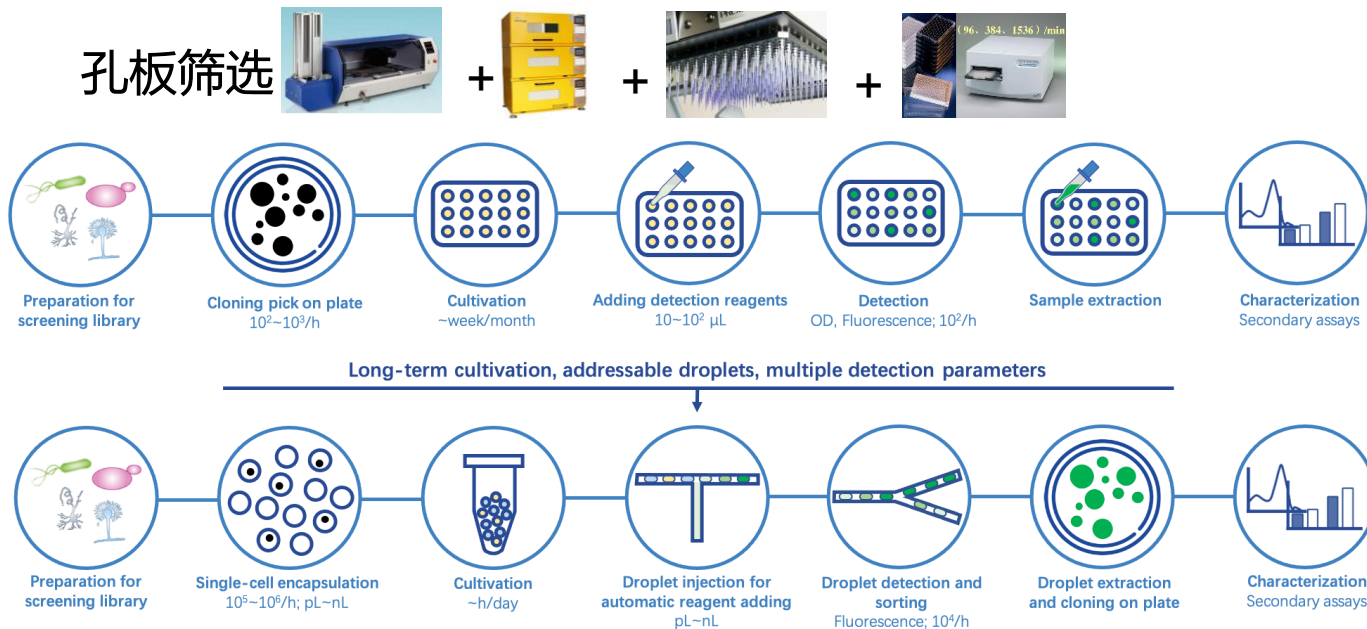
发酵36 h诱变菌株B4达到最大产酶419.11 U/mL, 是空白对照107.58 U/mL的**3.90倍**

微生物超高通量荧光激活分选装备研制

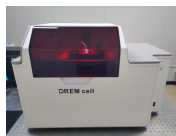
单细胞荧光液滴激活分选仪（DREM Cell）



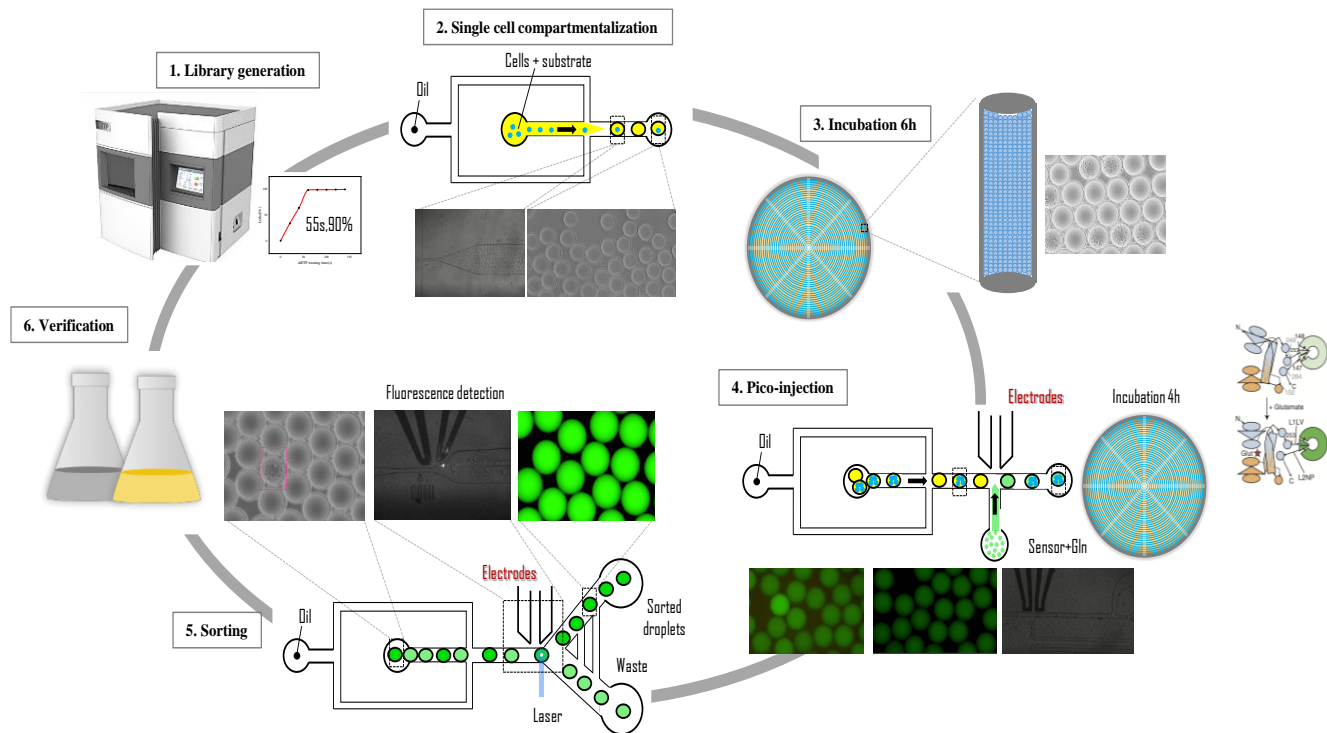
DREM Cell高通量筛选工作流程



DREM Cell

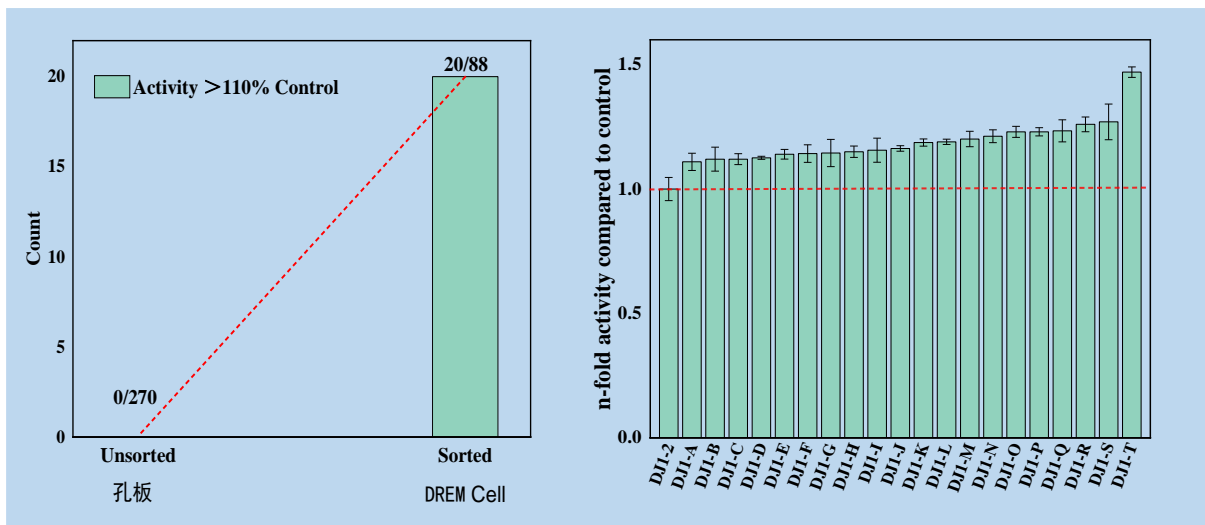


例：高产谷氨酰胺酶解淀粉芽孢杆菌高通量诱变与筛选



Unpublished data

高产谷氨酰胺酶解淀粉芽孢杆菌筛选结果



DREM Cell: 10万CFU/天（9小时），培养基0.5ml，检测试剂0.2mL，矿物油0.3mL

孔板: 1000CFU/天（270CFU/2月），需100天，培养基消耗60L，检测试剂10L，耗材？

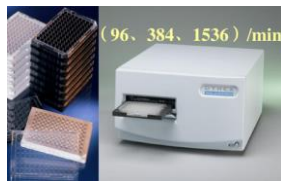
Unpublished data

全自动、高通量、智能化微生物液滴培养及筛选设备平台 将变革微生物菌种育种模式和速度

菌种自动筛选工作站



多孔板培养体系



试管



摇瓶



深孔板



移液工作站



菌落自动挑仪



分光光度计



生长曲线测定仪



酶标仪



恒温摇床



系列高通量微生物育种装备成功实现商业化应用

- 销售**300+**台/套
- 服务国内外**400+**家机构



出口

日本

- 味之素、神户大学

新加坡

- ICES

美国

- 夏威夷大学

法国

- Lesaffre

丹麦

- 丹麦技术大学

俄罗斯

- Genetika

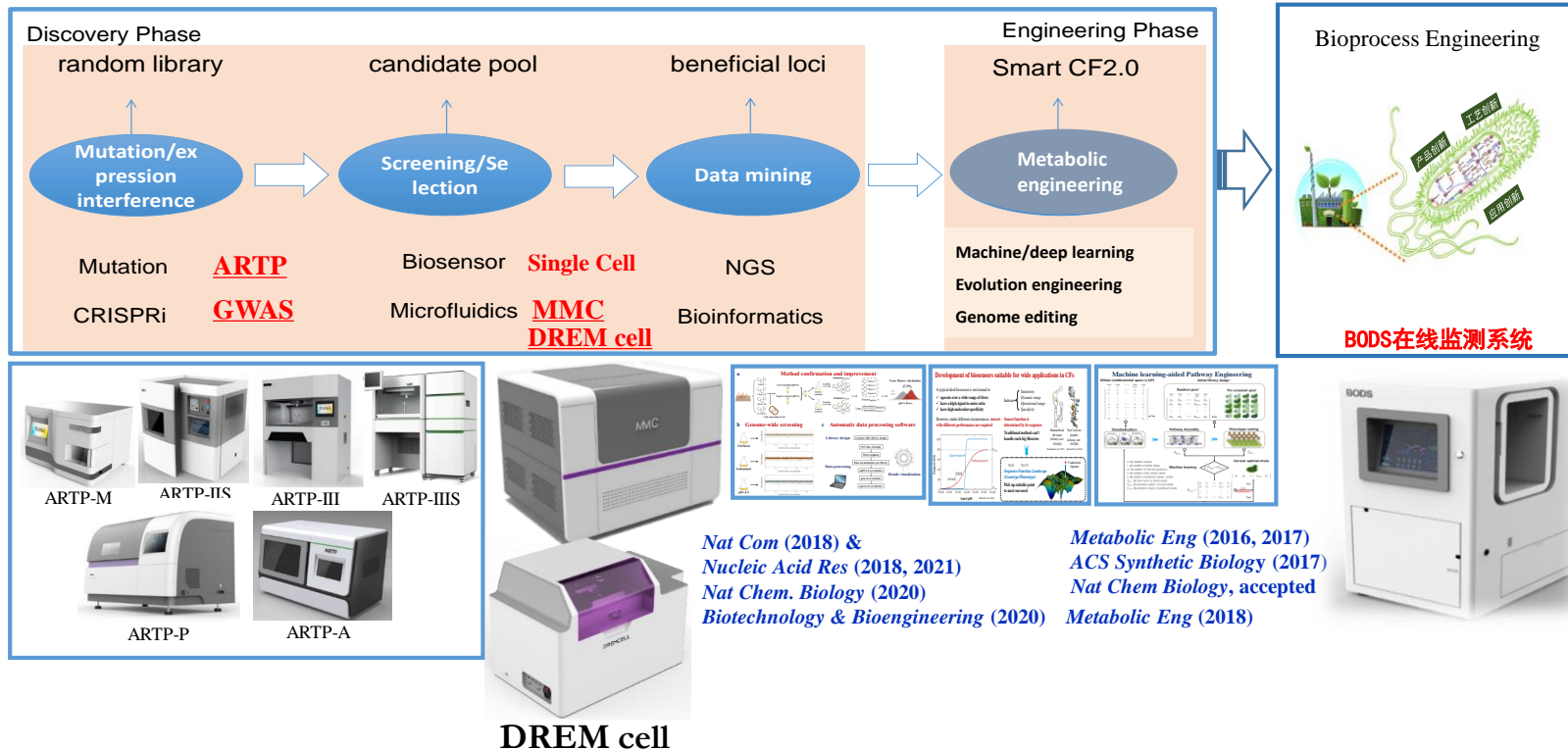


至2022年2月，采用我们的高通量育种技术发表：

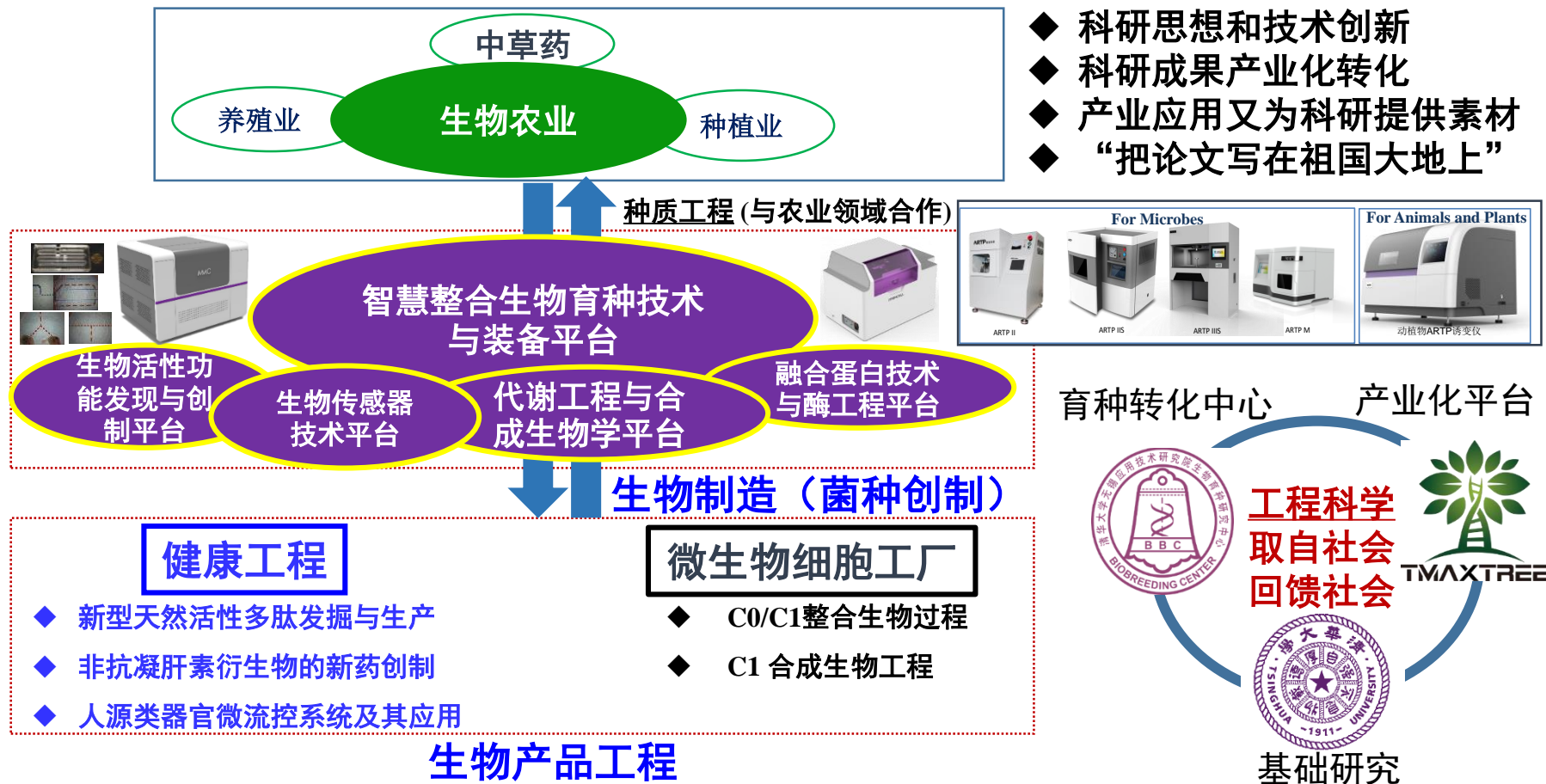
中文文献**381**篇，英文文献**161**篇，专利**180**件，学位论文**165**篇，共计**887**篇。



总结：智慧生物育种技术与装备成为工业微生物 科研和生物产业创新平台

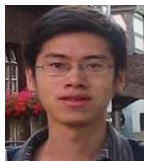


TU-BIG团队理念：问题导向，兴趣驱动，道器合一，德才兼备



致谢

清华TU-BIG团队 (Tsinghua U Biobreeding Technology and Instrumentation Group)



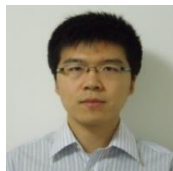
张翀副教授
代谢工程,
合成生物学,
高通量技术
与装备



卢元助理教授
无细胞合成生物学,
蛋白质工程,
疫苗工程



王怡助理研究员
多糖多肽,
炎症防控,
生物医药,
类器官功效评价



苏楠研究助理
酶工程, 临床检
测技术与装备,
蛋白工程



李和平副教授
清华工物系PI,
等离子体物理及
健康科学



王立言博士
& CEO
生物育种
技术孵化
与装备化



主要合作者



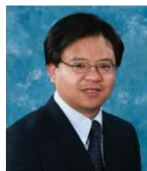
近藤昭彦教授
日本神户大学,
理研,
代谢工程,
合成生物学,
系统生物技术



姜岷 教授
南京工业大学,
生物化工,
生物炼制
生物材料



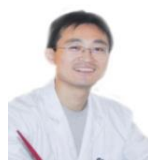
何明雄 教授
中国农业部
沼气研究所,
生物能源,
生物炼制



杨世辉 教授
湖北大学,
代谢工程
合成生物学
生物能源,
生物炼制



杨广宇副教授
上海交通大学,
微生物学,
酶工程,
生物炼制



陈双喜教授
河南大学,
生物过程工程,
益生制品工程



Prof. Itai Benhar
Tel-Aviv
University,
抗体工程,
双功能抗体



费强教授
西安交大,
生物发酵,
C1生物技术,
生物炼制

