



# 生物育种研究中心

BIOBREEDING CENTER, TWRI, TSINGHUA

## 高通量ARTP生物育种 理论与实践

1, 4                      1, 2                      1, 2                      1, 3  
王立言      张翀      邢新会      李和平

1. 清华大学无锡应用技术研究院 生物育种研究中心
2. 清华大学化学工程系
3. 清华大学工程物理系
4. 无锡源清天木生物科技有限公司

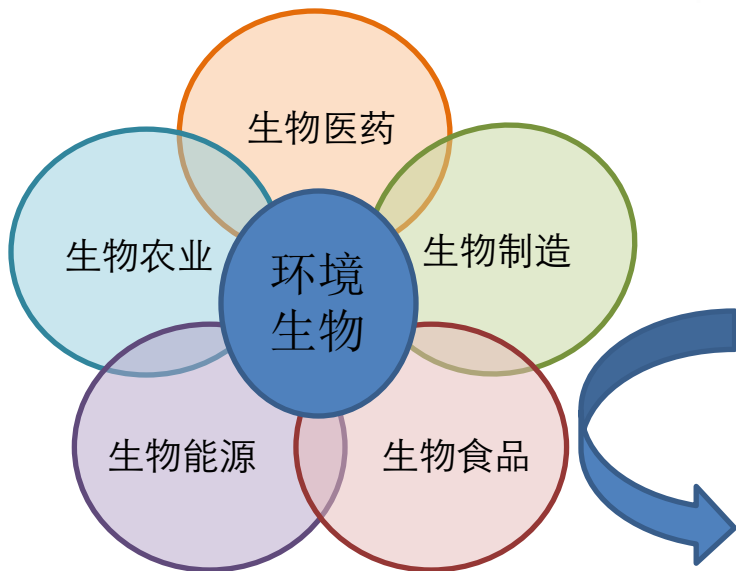
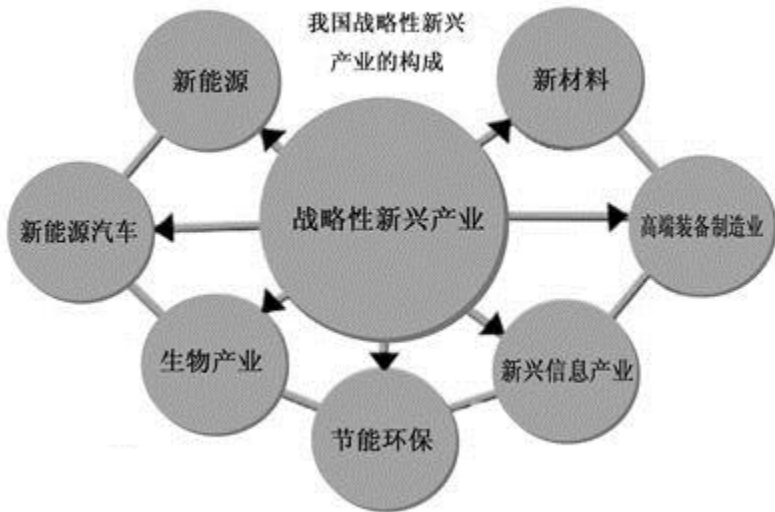
# 创新、务实、合作、共赢





# 生物产业是可持续发展的支柱产业

## 国务院发布七大战略性新兴产业 (20120530)



《工业生物技术年度发展报告》

**中国梦：蓝天、碧水、健康、幸福**

# 生物产业关系国计民生



## 工业生物技术重点方向：

- 生物化工
- 生物材料
- 生物能源
- 生物发酵
- 生物食品
- 绿色制造过程
- 特殊微生物资源与废弃物利用

生物制造产业是生物产业重点行业之一，是关系国计民生的重要产业。

“十一五”期间，我国生物制造产业一直呈高速增长态势，产业规模不断扩大。2009年我国生物制造产业实现总产值5500亿元，其中大宗发酵产品中的味精、柠檬酸、赖氨酸等产品的产量和贸易量位居世界前列，在国际上占有举足轻重的地位。

## 国务院发布七大战略性新兴产业（2012年5月份发布）

- （一）节能环保产业。
- （二）新一代信息技术产业。
- （三）生物产业要面向人民健康、农业发展、资源环境保护等重大需求，强化生物资源利用等共性关键技术和工艺装备开发，加快构建现代生物产业体系。
- （四）高端装备制造产业。
- （五）新能源产业要发展技术成熟的核电、风电、太阳能光伏和热利用、生物质发电、沼气等，积极推进可再生能源技术产业化。
- （六）新材料产业。
- （七）新能源汽车产业。

# 我国的生物产业缺乏核心竞争力

- ▶ 生产量大、生产效率低、利润薄;
- ▶ 出口原料多、终端产品少

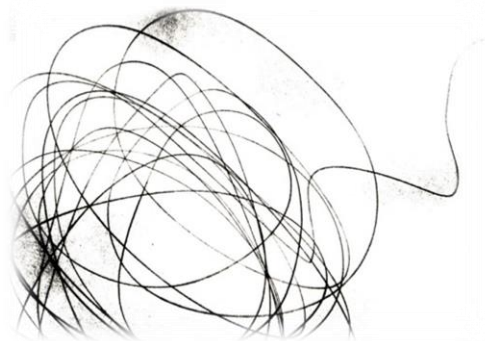
1. 研发能力差、  
自主创新能力不足  
人才储备不足



2. 产品同质化  
严重，缺乏龙  
头企业；鱼龙  
混杂。



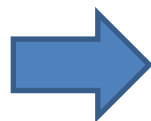
3. 科技产业转化  
率不高，“工程  
化”薄弱，专业  
公共服务缺失



4. 市场混乱，  
缺乏国家战略、  
有序竞争和协  
调分工

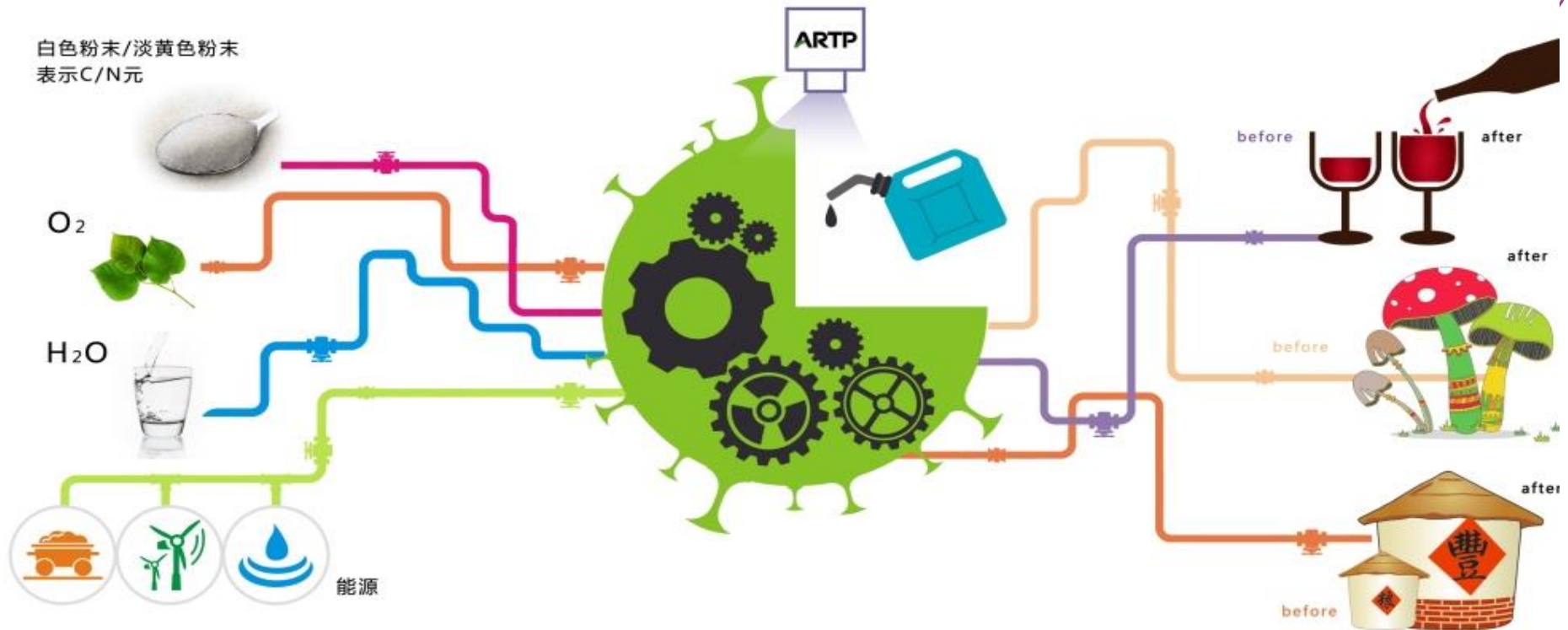


- ▶ 原创技术和原创产品稀少
- ▶ 平台方法、技术、装备缺乏  
自主知识产权



**缺乏核心竞争力**

# 性能优良的微生物是生物产业的核心之一



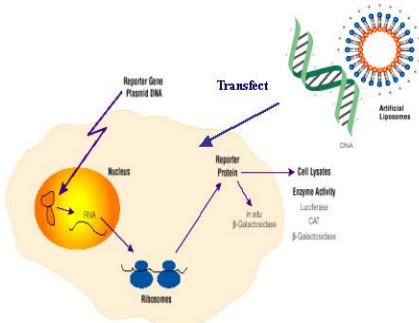
## 性能优良选育是生物产业的核心工作之一

- 《国务院关于印发生物产业发展规划的通知》（2012年12月）明确指出“**提升生物育种核心竞争力**”。
- 国家高技术研究发展计划（863计划）生物和医药技术领域2015年度申报指南（2014年4月）中，列出了“**有机酸高产菌株选育技术和装置开发**”的项目。
- 本技术和设备符合国家政策及产业需求，属于国家明确鼓励和支持发展的技术；同时也是国家符合国家生物发展的重要的战略性、平台性技术装备。

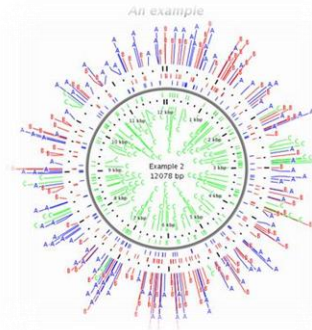
# 菌株的选育技术

## 分子生物学改造

- ✓ 基因背景清楚
- ✓ 热点研究领域
- 实验成本高（耗材）
- 设备仪器昂贵
- 人才素质要求高
- GMO，开放体系应用安全性尚待验证
- 适用范围窄
- 研发失败率高！



## 需要研发新型高效诱变育种技术及装备



## 诱变育种

- ✓ 使用范围广
- ✓ 成本低
- ✓ 实用性高
- ✓ 生产中广泛采用
- ✓ 非GMO
- ✓ 关注度高、研发热点
- 随机性较大



# 传统诱变育种手段及其局限性



## 化学诱变

碱基类似物

羟胺

亚硝酸

烷化剂

吡啶类



## 物理诱变

Co60

紫外线

电离辐射

太空诱变

离子束注入

等离子体





# 高效率突变+高通量筛选

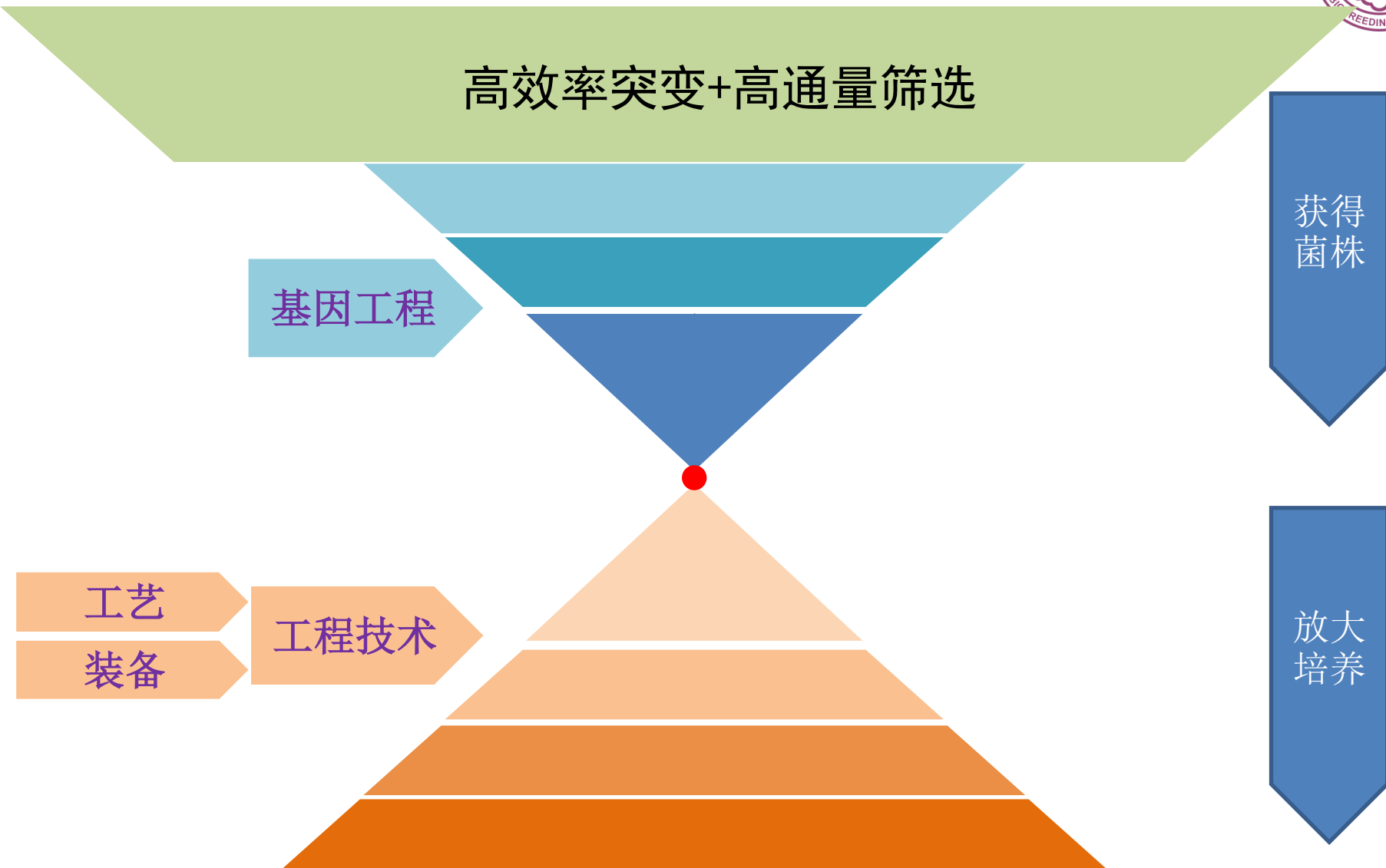
基因工程

获得菌株

工艺  
装备

工程技术

放大培养



# 生物育种研究中心



生物产业的核心是**性能优良的菌株**（微生物菌种或者植物种子等），生物产业的现状与良种的选育能力息息相关。为从核心提高我国生物产业的竞争力，清华大学化工系邢新会教授课题组、工物系李和平副研究员课题组及中科院、江南大学等兄弟院校的相关研究人员，与清华大学无锡应用技术研究院共同成立了“**生物育种研究中心**”；本研究中心将面向产业，形成多学科交叉的科研与特色技术服务平台。

“自强不息，厚德载物”。生物育种研究中心将以提升中国生物产业的核心竞争力为己任，以“**顶天、立地、树人**”的科研与经营理念，将清华大学等科研院所的最前沿的科研成果与科研力量嫁接、植根于产业，有力的推动我国生物产业的发展，为国家经济发展做出贡献。

**顶天** 前沿技术,勇于创新  
**立地** 扎根产业,专业服务  
**树人** 人才培养,全方位提升生物产业  
核心竞争力



1. 菌株改造技术服务；
2. 人才培养；
3. 科研项目合作；
4. 新产品储备。

## 提升产业 核心竞争力！

(授人以鱼不如授人以渔)

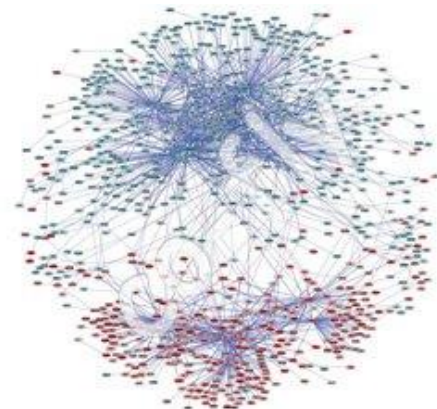
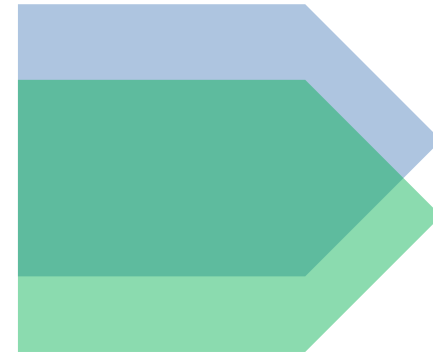


核心技术之一：高效率突变

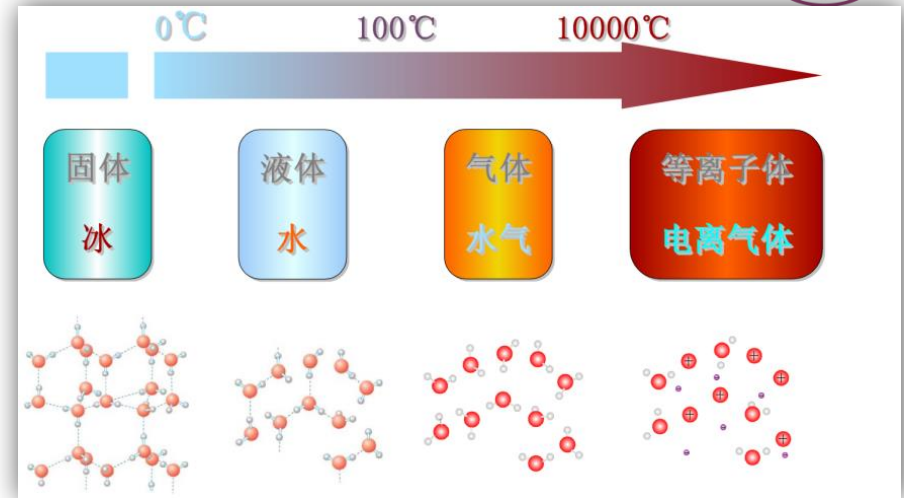
ARTP

(Atmospheric Room Temperature Plasma)

常压室温等离子体突变技术



# PLASMA?



- 什么是等离子体？
- 等离子体里含有什么？  
( 均匀、活性粒子丰富、温度低、大气压条件放电 )
- 为什么等离子体可以诱变育种？

# 什么是等离子体？

定义：

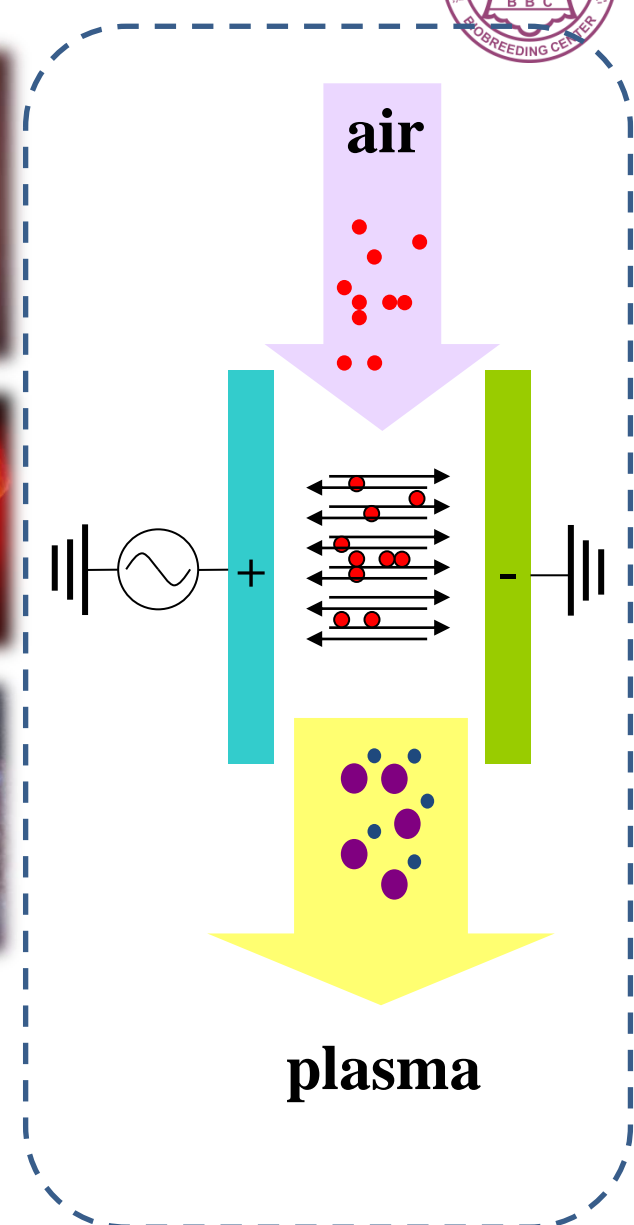
- 等离子体 (Plasma) 是与物质的固态、液态和气态并存的物质第四态 (1879, 英, W. Crooks), 是一种正离子和电子的密度大致相等的电离气体。 (1928, 美, I. Langmuir)

特点：

- 分布广
- 导电流体；
- 化学性质活泼；
- 发光特性。



产生方式：  
 高温（自然界广泛存在）  
 放电（人工常见）





# 常压室温等离子体----ARTP

- 电晕放电 (corona discharge)
- 火花放电 (spark discharge)
- 介质阻挡放电  
(dielectric barrier discharge, DBD)
- 辉光放电 (glow discharge)
- 电弧放电 (arc discharge)
- 微波放电 (microwave discharge)

大气压辉光放电是一个被广泛使用的、用来描述大气压条件下各种气体放电冷等离子体的总称。采用裸露金属电极结构的大气压射频辉光放电等离子体源是近几年提出的一种新的大气压辉光放电冷等离子体源。为了从生物技术应用的角度突出这种等离子体源的特点，表示为 **常压室温等离子体 (Atmospheric Room Temperature Plasma, ARTP)**。

## 辉光放电等离子体优势

常压操作

设备简易

操作简便

造价低廉

工业

微、纳米材料制备

表面刻蚀、薄膜沉积等

微反应器、反应催化

军事

生化武器毒害物质的降解、应急反恐

生化医药  
与环境科学等领域

热敏性器具的杀菌消毒

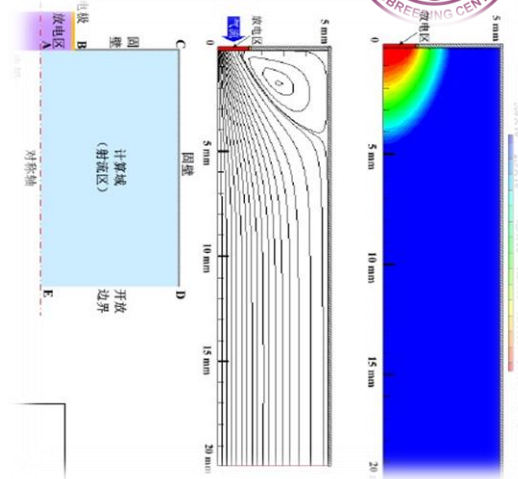
空气净化与食品安全

生物难降解物的降解

研究领域  
消毒杀菌机理,  
开拓应用领域,  
。 。 。

# ARTP技术的特点

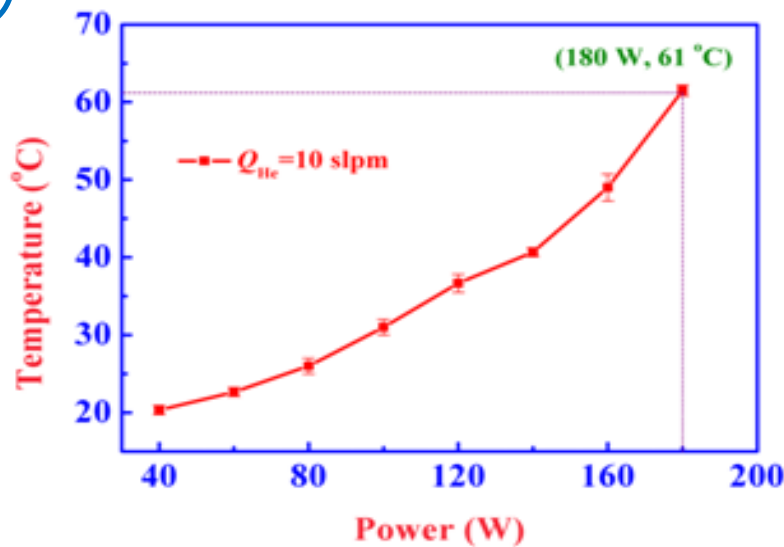
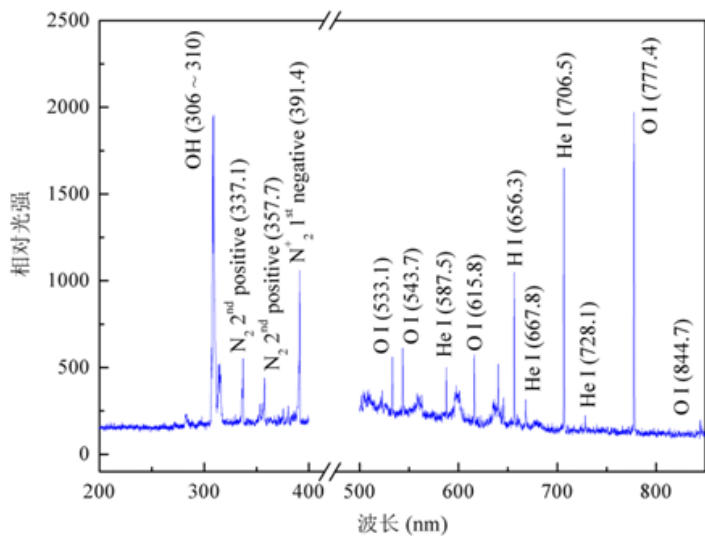
- ① 放电均匀
- ② 活性粒子种类丰富
- ③ 射流温度低



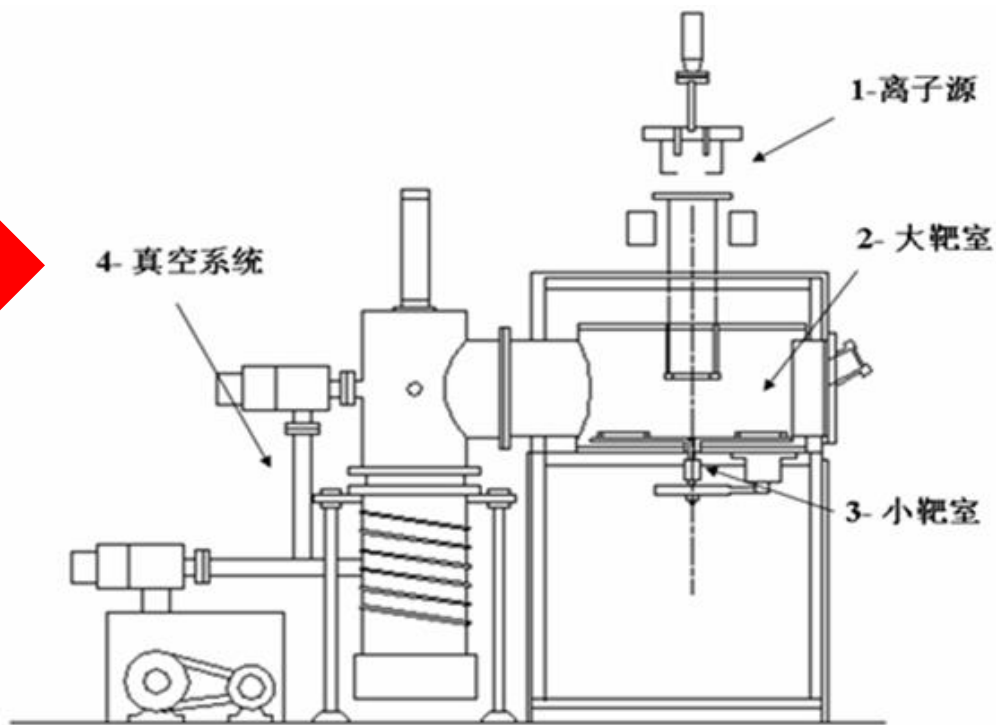
1

2

3



# 同离子束注入突变技术及设备的比较



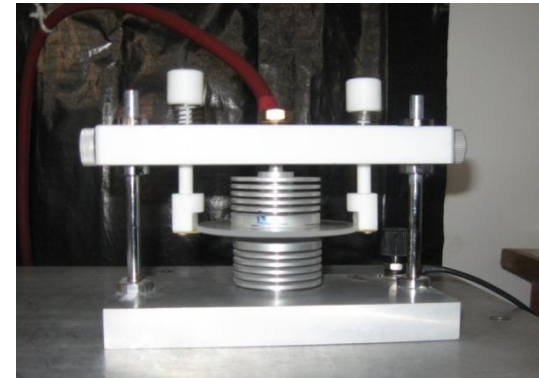
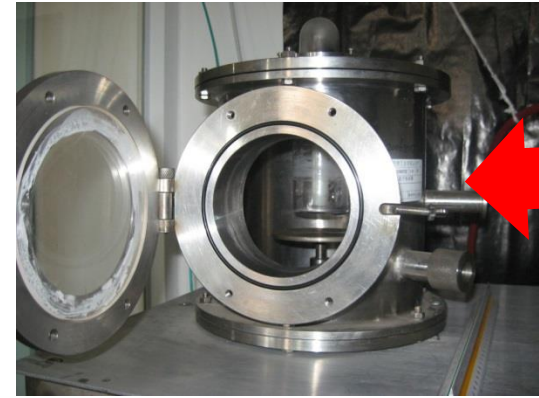
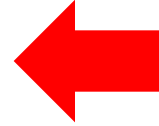
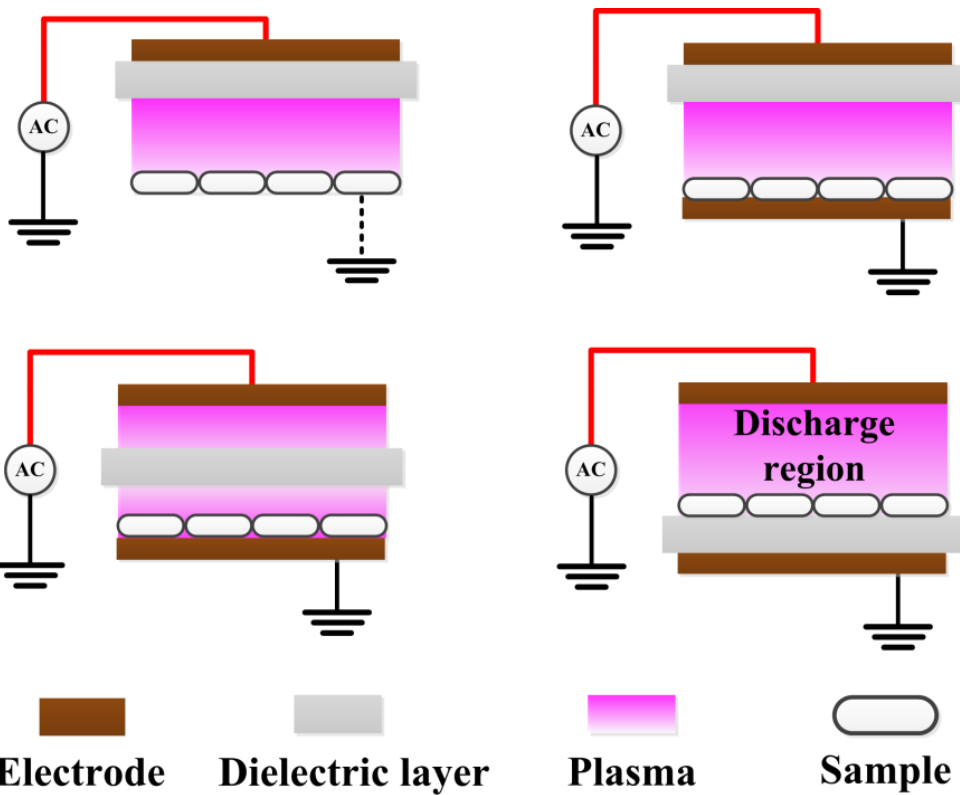
离子注入机结构示意图



霍裕平 院士

余增亮 研究员

# 与DBD ( 介质阻挡放电 ) 等离子体突变技术的比较



## DBD放电特点

- 电极板之间有绝缘介质
- 常压放电
- 交流放电
- 紫外线、臭氧强烈

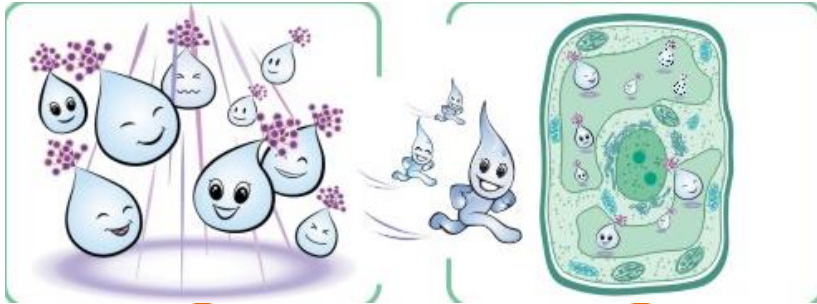


From: Chen HX, et al, IEEE Trans Plasma Sci, 2010, 38 (8): 1885; Hou YM, et al, IEEE Trans Plasma Sci, 2008,36 (4): 1633; Jin Y, et al, Plasma Sci Technol, 2007, 8 (6): 720; Yu H, et al, IEEE Trans Plasma Sci, 2005, 33 (4): 1405; Dong XY, et al, IEEE Trans Plasma Sci, 2009, 37 (6): 920; Dong XY, et al, Biotechnol Lett, 2010, 32 (9): 1245; Wang M, et al, Acta Agriculturae Boreali-Sinica, 2007, 22 (6): 108 (In Chinese); Wang M, et al, Transactoins of the Chinese Society of Agricultural Engineering, 2007, 23 (2): 195 (In Chinese); Zhou ZW, et al, J Anhui Ari Sci, 2010, 38 (2): 1085 (In Chinese)

# 技术比对



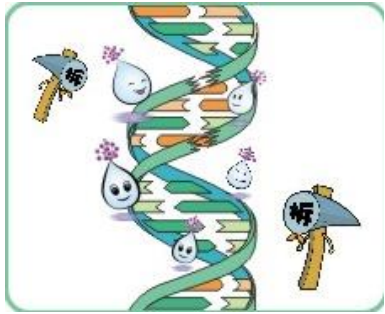
方法	安全性	使用便捷性	应用广谱性	使用效果	应用成本
化学诱变	-	+	+	+	+++
常规物理诱变	+	++	++	+	+++
分子生物学	+	-	-	+	
DBD	+	++	+	+	+
离子束注入	+	-	+++	+	+
<b>ARTP</b>	<b>+++</b>	<b>+++</b>	<b>+++</b>	<b>+++</b>	<b>+++</b>



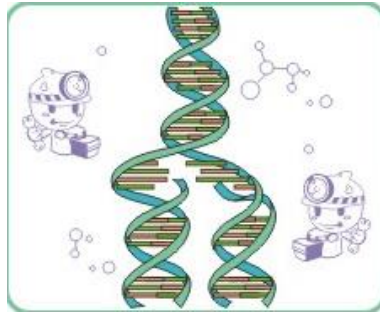
1



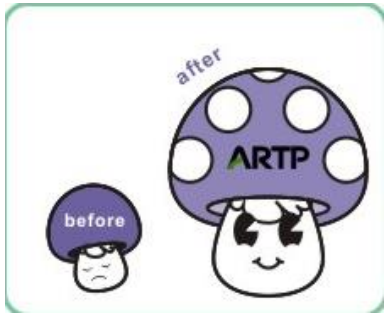
2



3



4



5

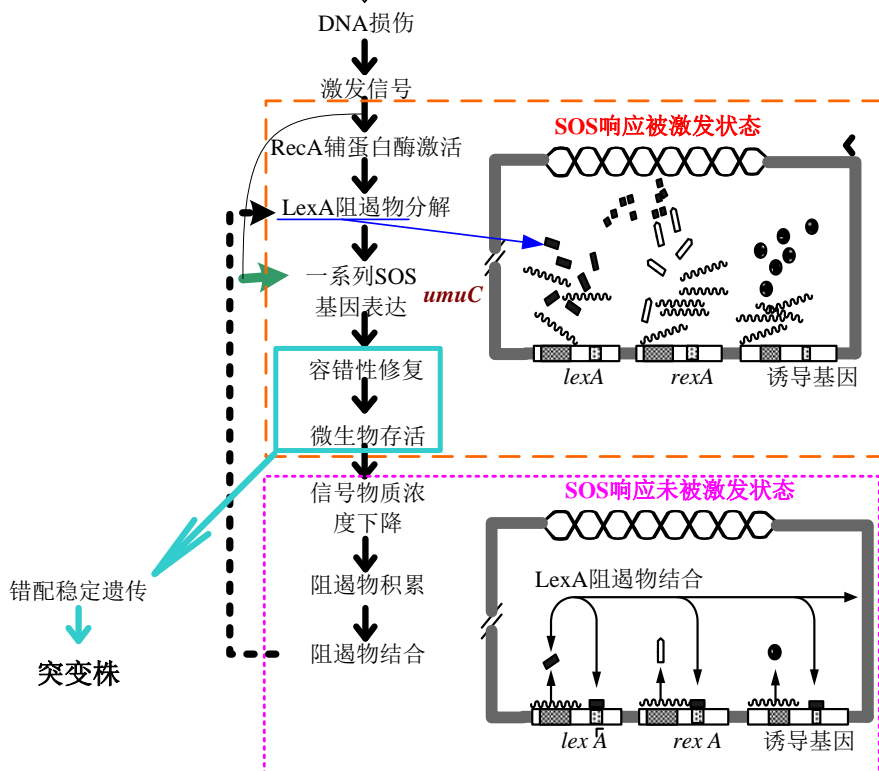
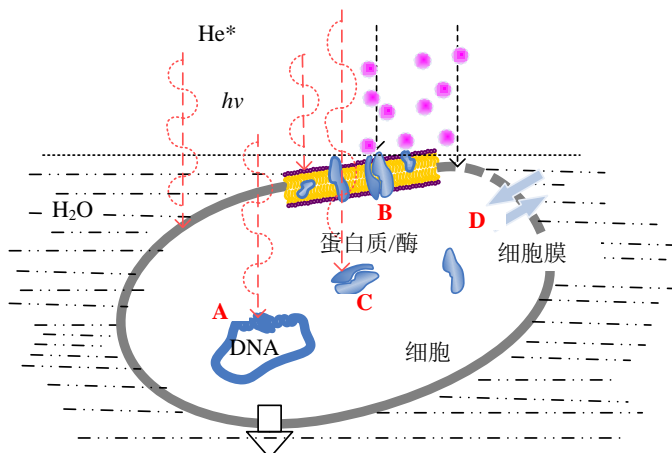
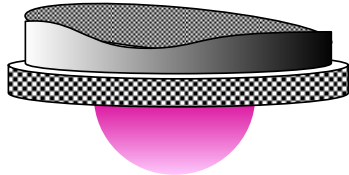


6

# PRINCIPLE?

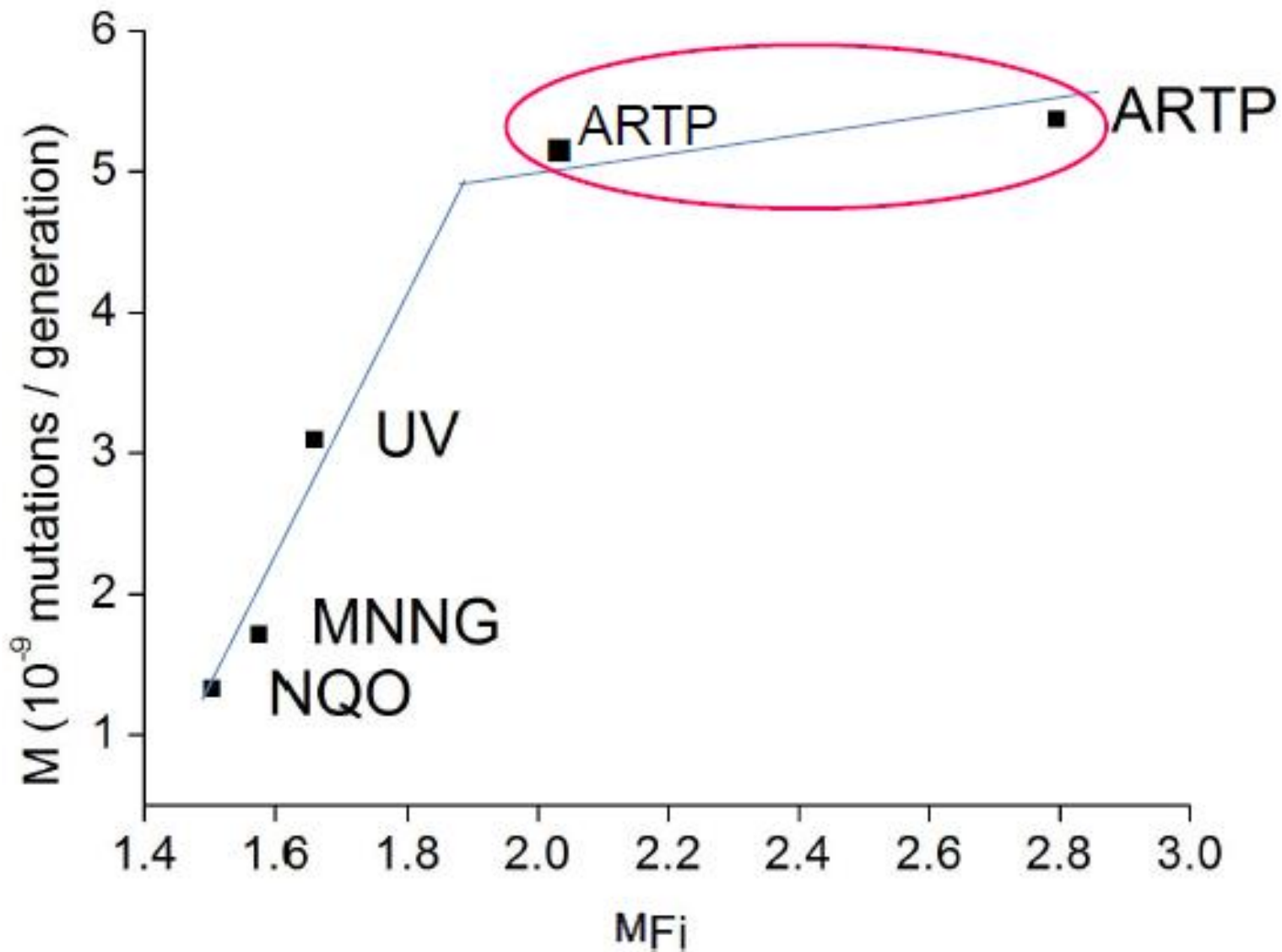
- 与遗传物质作用？
- 对整细胞作用？
- 诱变机理？

ARTP





# SOS response (MFi) vs mutation rate (M)



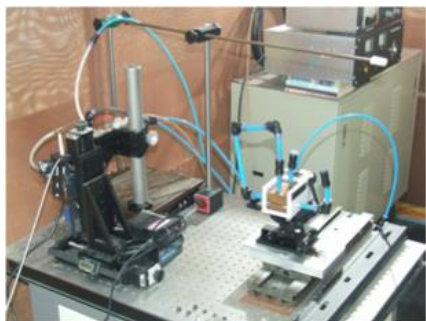
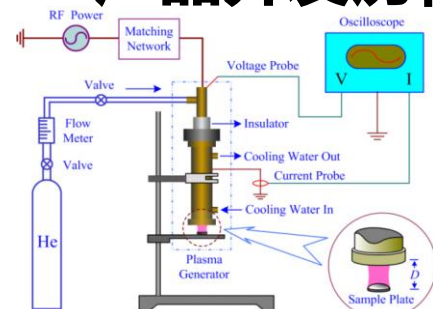


# ARTP mutagenesis mechanism: Hot spot analysis

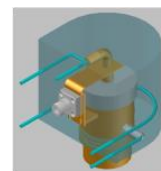
The hot spot for ARTP and ion beam implantation

Site	AA change	bp change	Wild (50 colonies)	ARTP (100 colonies)	10 KeV N <sup>+</sup> (50 colonies)	Site	AA change	bp change	Wild (50 colonies)	ARTP (100 colonies)	10 KeV N <sup>+</sup> (50 colonies)
1518	NON	GC-AT	15			1532	S-G	AT-GC		6	
1535	D-N	GC-AT		15		1534	D-G	AT-GC	5	7	
1546	D-N	GC-AT			10	1547	D-G	AT-GC			7
1565	D-N	GC-AT	1			1552	N-D	AT-GC			9
1576	C-Y	GC-AT		22		1598	L-P	AT-GC			2
1586	R-H	GC-AT			1				9.4%	13.1%	22.8%
1592	E-K	GC-AT	1	5		1715	I-L	AT-CG	4		
1600	G-S	GC-AT			7				7.55	0.0%	0.0%
1691	G-R	GC-AT	1	7		1547	D-V	AT-TA			8
1721	E-K	GC-AT	4	6		1577	H-L	AT-TA			5
			41.5%	55.6%	22.8%	1714	I-F	AT-TA			1
1527	W-C	GC-CG	3						0.0%	0.0%	17.7%
1576	C-S	GC-CG	1			1538	*-G	TA-GC	3		
1716	NON	GC-CG		1		1714	I-S	TA-GC	1		
			7.5%	1.0%	0.0%				7.5%	0.0%	0.0%
1535	D-Y	GC-TA		1		1538	*-R	TA-AT		1	
1576	C-F	GC-TA	8	1		1598	L-H	TA-AT			1
1721	E-*	GC-TA	4			1714	I-N	TA-AT		1	
			22.6%	2.0%	0.0%				0.0%	2.0%	1.3%
1546	S-F	CG-TA		17		1547	S-P	TA-CG	2	9	
1565	S-F	CG-TA			5	1598	L-H	TA-CG			1
1576	H-Y	CG-TA			8				3.8%	9.1%	1.3%
1592	S-F	CG-TA			12						
1692	P-L	CG-TA			2						
			0.0%	17.2%	34.2%	<b>TOTAL</b>			<b>53</b>	<b>99</b>	<b>79</b>

# ARTP产品开发历程 (2006-现在)



核心部件：  
单通道等离子体发生装置

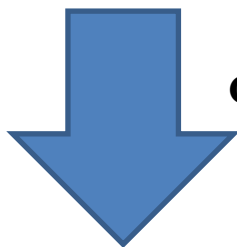


第一代样机

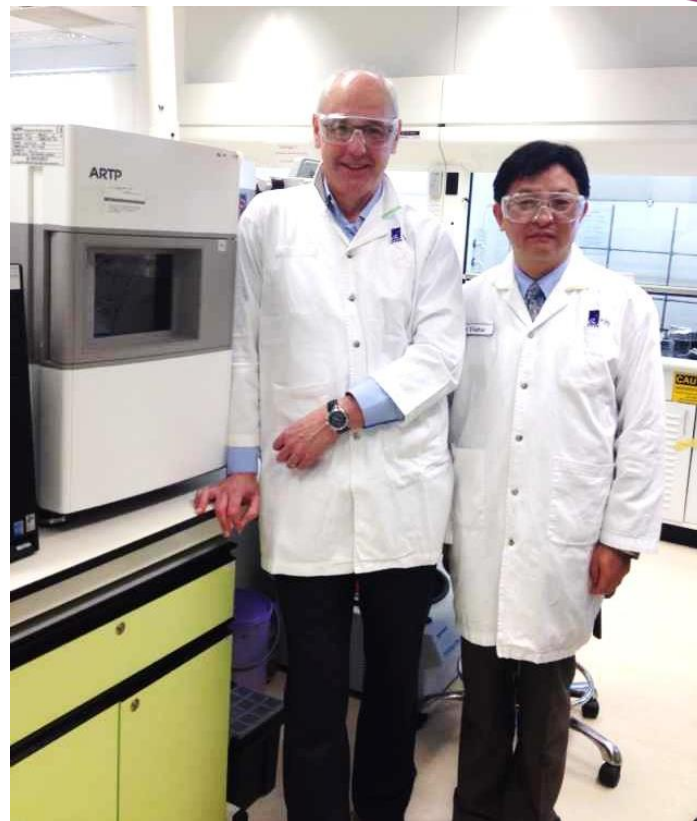
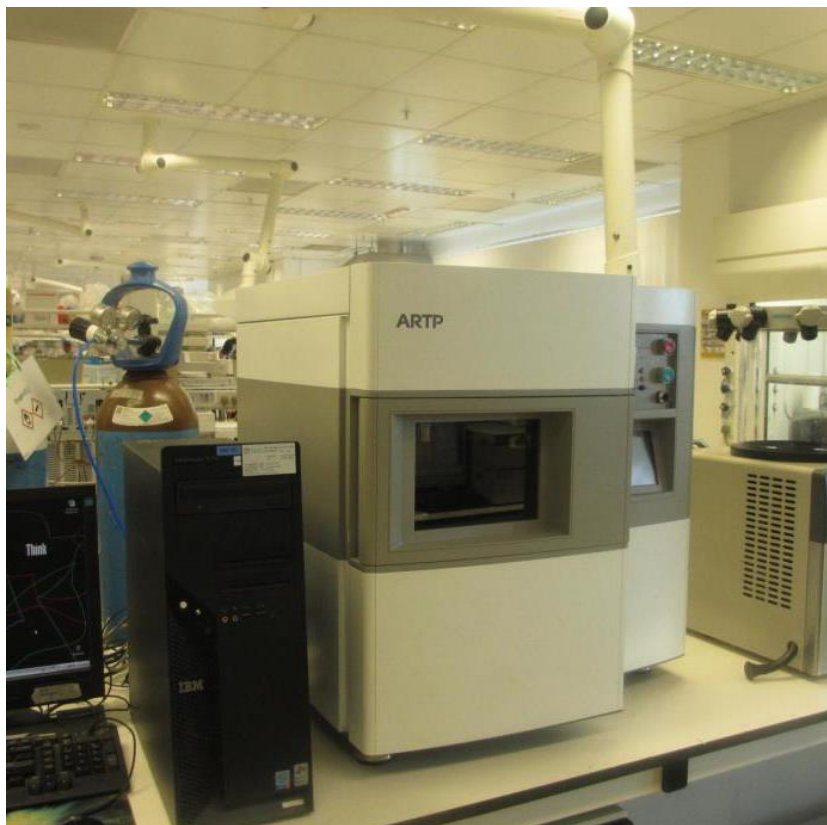


第二代样机

**Commercialized**  
**ARTP® Breeding System**  
**Chinese Patent**



# 设备出口新加坡、日本



Dr Keith Carpenter and Prof. Xing

# 新加坡A. STAR, ICES研究所

# 设备专利



证书号第2281581号



## 实用新型专利证书

实用新型名称: 等离子体微生物诱变育种设备

发明人: 毕鲜荣; 冯权; 葛楠

专利号: ZL 2011 2 0425946.4

专利申请日: 2011年11月01日

专利权人: 北京思清源生物科技有限公司

授权公告日: 2012年07月04日

本实用新型经过本局依照中华人民共和国专利法进行初步审查, 决定授予专利权并在专利登记簿上予以登记。专利权自授权公告之日起生效。

本专利的专利权期限为十年, 自申请日起算。专利权人应当依照专利法及其实施细则缴纳年费。本专利的年费应当在每年11月01日前缴纳。未按照规定缴纳年费, 专利权自应当缴纳年费期满之日起终止。

专利证书记载专利登记时的法律状况。专利权的转移、质押、无效、终止, 专利权人的姓名或名称、国籍、地址变更等事项记载在专利登记簿上。



局长 田力普



证书号第2354663号



## 实用新型专利证书

实用新型名称: 一次性微生物诱变育种机用载片

发明人: 卢海涛; 冯权; 毕鲜荣; 梁鹏; 张伟

专利号: ZL 2011 2 0514292.2

专利申请日: 2011年12月12日

专利权人: 北京思清源生物科技有限公司

授权公告日: 2012年08月15日

本实用新型经过本局依照中华人民共和国专利法进行初步审查, 决定授予专利权并在专利登记簿上予以登记。专利权自授权公告之日起生效。

本专利的专利权期限为十年, 自申请日起算。专利权人应当依照专利法及其实施细则缴纳年费。本专利的年费应当在每年12月12日前缴纳。未按照规定缴纳年费, 专利权自应当缴纳年费期满之日起终止。

专利证书记载专利登记时的法律状况。专利权的转移、质押、无效、终止, 专利权人的姓名或名称、国籍、地址变更等事项记载在专利登记簿上。



局长 田力普



第1页 (共1页)

证书号第1030158号



## 发明专利证书

发明名称: 利用等离子体技术进行液体表面处理装置及处理方法

发明人: 邢新会; 王立言; 李和平; 李果; 冯权; 毕鲜荣

专利号: ZL 2008 1 0175873.0

专利申请日: 2008年11月07日

专利权人: 北京思清源生物科技有限公司

授权公告日: 2012年08月29日

本发明经过本局依照中华人民共和国专利法进行审查, 决定授予专利权, 颁发专利证书并在专利登记簿上予以登记。专利权自授权公告之日起生效。

本专利的专利权期限为二十年, 自申请日起算。专利权人应当依照专利法及其实施细则缴纳年费。本专利的年费应当在每年11月07日前缴纳。未按照规定缴纳年费, 专利权自应当缴纳年费期满之日起终止。

专利证书记载专利登记时的法律状况。专利权的转移、质押、无效、终止, 专利权人的姓名或名称、国籍、地址变更等事项记载在专利登记簿上。



局长 田力普



第1页 (共1页)

证书号第774780号



## 发明专利证书

发明名称: 利用大气压冷等离子体发生器提高酶的活性的方法

发明人: 李和平; 王立言; 李果; 邢新会; 乐沛思; 包成玉; 冯权

专利号: ZL 2009 1 0237616.X

专利申请日: 2009年11月13日

专利权人: 清华大学; 北京思清源生物科技有限公司

授权公告日: 2011年05月11日

本发明经过本局依照中华人民共和国专利法进行审查, 决定授予专利权, 颁发专利证书并在专利登记簿上予以登记。专利权自授权公告之日起生效。

本专利的专利权期限为二十年, 自申请日起算。专利权人应当依照专利法及其实施细则缴纳年费。本专利的年费应当在每年11月13日前缴纳。未按照规定缴纳年费的, 专利权自应当缴纳年费期满之日起终止。

专利证书记载专利登记时的法律状况。专利权的转移、质押、无效、终止, 专利权人的姓名或名称、国籍、地址变更等事项记载在专利登记簿上。



局长 田力普



第1页 (共1页)

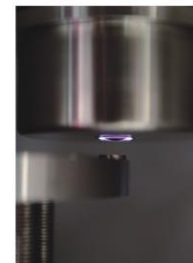
# ARTP诱变育种技术优势



1 菌悬液均匀涂抹在金属载物台上  
Bacterial solution and spreading



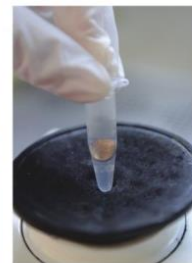
2 使用镊子将菌物载片转移到载物台上  
Transferring the metal plate to objective table



3 设定参数，ARTP处理  
Setting the parameter, and operating



4 将EP管插入到EP管口  
Inserting EP tube to EP tube



5 震荡洗脱形成新的菌悬液  
Shaking and washing into bacterial solution



6 涂布后培养  
Spreading the plate





# 六大优势之一 高效

Table 2. The mutation and positive mutation rate of ARTP jet on *Streptomyces albulus*.

	T	T'	M	P
Colony number	342	226	108	89
R <sub>M</sub> 突变率	31.6%			
R <sub>P</sub> 正突变率	26.0%			

T is the total colony count after treatment with ARTP on the solid medium without AEC and glycine; T' is the total colony count after treatment on the solid medium with AEC and glycine; M is the total CFU of the mutants; P is the CFU of the mutants with a yield of  $\epsilon$ -PL 20% higher than that of the original strain; R<sub>M</sub> and R<sub>P</sub> represent mutation and positive mutation rate respectively, R<sub>M</sub> = (M/T)  $\times$  100%; R<sub>P</sub> = (P/T)  $\times$  100%.

正突变菌株： $\epsilon$ -聚赖氨酸产量提高20%以上

菌株	$\epsilon$ -PL产量 (g/L) /传代次数				
	F1	F2	F3	F4	F5
A-29	1.59	1.43	1.40	1.57	1.50
A-45	1.48	1.56	1.39	1.49	1.40

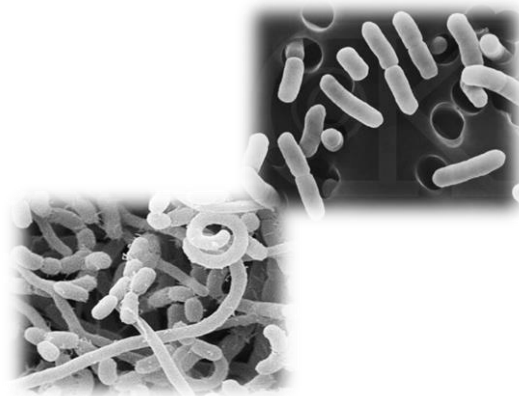
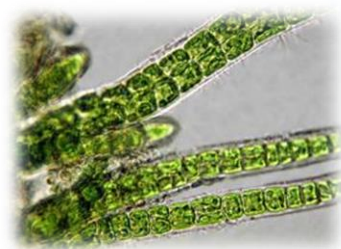
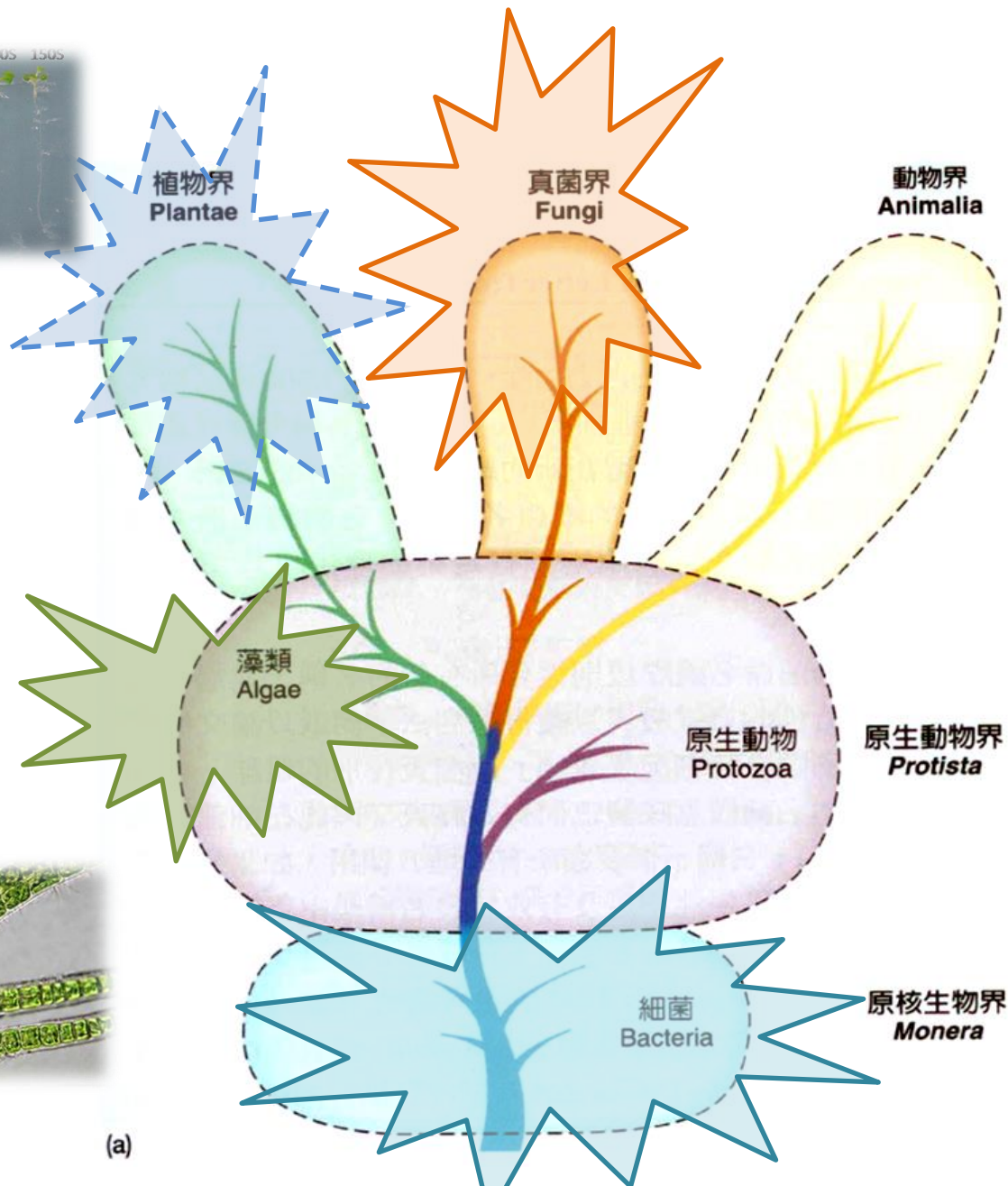
遗传稳定性良好

A new mutation breeding method for *Streptomyces albulus* by an atmospheric and room temperature plasma

# 六大优势之二——普适



05 305 605 905 1205 1505



(a)

# 六大优势之三 兼容

分子生物学

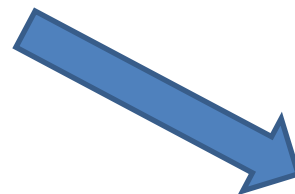
UV

化学诱变

离子束注入等



ARTP



优良菌株



## 六大优势之四 便捷



设备操作流程：

1. 准备工作；
2. 打开电源；
3. 紫外灭菌**15min**；
4. 设定工作条件，进行处理；
5. 处理完毕后关闭电源；

# 六大优势之五 快速



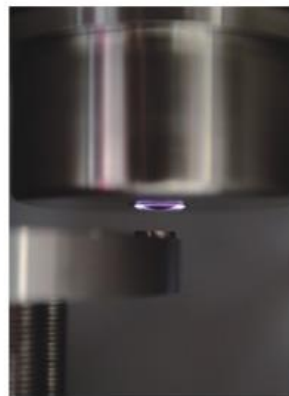
菌悬液均匀涂抹在金属载片的上表面  
Dropping bacterial solution on metal plate and spreading

1



使用镊子将菌物载片转移到载物台  
Transferring the metal plate to objective table

2



设定参数，ARTP处理  
Setting the parameter, and operating

3



处理后将载片转移到EP管  
Putting the plate into EP tube

4



震荡洗脱形成新的菌悬液  
Shaking and washing into bacterial solution

5



涂布后培养  
Spreading the plate

6

# 六大优势之六 安全



清华大学建筑环境检测中心  
Center for Building Environment Test, Tsinghua University  
检测报告  
Test Report

报告编号: R12-001E 第 1 页 共 4 页

检测项目	环境电磁辐射强度检测	规格型号	ARTP
样品编号	/	样品编号	R12-001E
委托单位	清华大学工程物理系		
生产单位	/		
送样日期	2012年5月9日	送样数量	1
送样人	李和平		
检测项目	环境电磁辐射强度检测	检测类别	委托检测
检测依据	1. GB9175-88《环境电磁波卫生标准》 2. GB8702-88《电磁辐射防护规定》		
检测地点	新化工系馆 601	检测日期	2012年5月9日
检测结论	现场检测的结果表明: 生物育种机周围存在不同程度的电磁干扰, 但测量结果满足国家标准的要求。		
备注	/		
检测	李和平	审核	徐志华
日期	2012年5月17日		

根据GB8702-88 (《电磁辐射防护规定》) 检测:  
 国标中规定的电场强度安全上限为67/ , 本设备的频率为13.56MHz  
 , 则67/ =18.2(V/m)=145(dBμV/m); 而实测值最高为106.6 (dBμV/m) ,远低于上限值。

**检测结论:** “现场检测的结果表明: 育种机工作时附近存在不同程度的电磁干扰, 但测量结果满足国家标准的要求。”

**防范措施:**

根据实测结果, 操作本设备不需要额外的防护措施; 但为避免潜在的电磁辐射, 我们建议操作者不要在设备运行时长时间靠近设备。



Shenzhen BST Technology Co., Ltd.

Report No.: SHBST2013071602ER-1

BEIJING SI QING YUAN BIOTECHNOLOGY CO., LTD.



Prepared For:	SHENZHEN SUNSOM AUTOMATION EQUIPMENT CO., LTD. Room D611, 2Xixi Road, Shangdi, Haidian District, Beijing, China 100085
Product Name:	ARTP (ATMOSPHERIC ROOM TEMPERATURE PLASMA) MUTAGENESIS BREEDING SYSTEM
Model:	ARTP-II
Prepared By:	Shenzhen BST Technology Co., Ltd. Building No.23-24, Zhiheng Industrial Park, Guanikouer Road, Nantou, Nanshan District, Shenzhen, Guangdong, China
Test Date:	Jul. 17-18, 2013
Date of Report:	Jul. 18, 2013
Report No.:	SHBST2013071602ER-1



Shenzhen BST Technology Co., Ltd.

Report No.: SHBST2013071602SR-2

BEIJING SI QING YUAN BIOTECHNOLOGY CO., LTD.



Prepared For:	BEIJING SI QING YUAN BIOTECHNOLOGY CO., LTD. Room D611, 2Xixi Road, Shangdi, Haidian District, Beijing, China 100085
Product Name:	ARTP (Atmospheric Room Temperature Plasma) Mutagenesis Breeding System
Model:	ARTP-II
Prepared By:	Shenzhen BST Technology Co., Ltd. Building No.23-24, Zhiheng Industrial Park, Guanikouer Road, Nantou, Nanshan District, Shenzhen, Guangdong, China
Test Date:	Jul. 10, 2013- Jul. 18, 2013
Date of Report:	Jul. 18, 2013
Report No.:	SHBST2013071602SR-2



## ARTP的应用领域

1. 诱变育种！
2. 高通量、大容量突变库的构建！
3. 基因组学分析的强有力辅助工具！

### 应用成果斐然：

目前应用已发表论文、专利等80余篇。  
其中sci论文20余篇。

(详情点击网站[www.biobreeding.com](http://www.biobreeding.com))



# Atmospheric and room temperature plasma (ARTP) as a new powerful mutagenesis tool

Xue Zhang · Xiao-Fei Zhang · He-Ping Li ·  
 Li-Yan Wang · Chong Zhang · Xin-Hui Xing ·  
 Cheng-Yu Bao

Received: 21 January 2014 / Revised: 4 April 2014 / Accepted: 5 April 2014  
 © Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2014

**Abstract** Developing rapid and diverse microbial mutation tool is of importance to strain modification. In this review, a new mutagenesis method for microbial mutation breeding using the radio-frequency atmospheric-pressure glow discharge (RF APGD) plasma jets is summarized. Based on the experimental study, the helium RF APGD plasma jet has been found to be able to change the DNA sequences significantly, indicating that the RF APGD plasma jet would be a powerful tool for the microbial mutagenesis with its outstanding features, such as the low and controllable gas temperatures,

## Introduction

Microbial breeding by altering the genomes is of great importance for biotechnology research and bioindustry. In nature, mutation combining with natural selection is the key driving force for the life evolution (Lee et al. 2012). However, from the viewpoint of strain modification/engineering with improved phenotypes or functions, the natural evolution process is always not efficient enough and takes long time due to the low spontaneous mutation rates (Drake et al. 1998). Therefore, many arti-

<i>E. coli</i> AFP111	—/—	Succinic acid yield reached 21.1 g l <sup>-1</sup>	
Fungi			
<i>T. viride</i> TL 124	—/—	Increase of the cellulase yield to 1.97-fold of the wild strain	Xu et al. (2011)
<i>R. toruloides</i> ACCC 20341	47.2/27.2	Increase of the lipid yield to 2.2-fold of that of the wild strain	Jin et al. (2011)
<i>R. toruloides</i> ACCC 20341	—/—	Tolerance to all the cellulose hydrolysis inhibitory compounds	Qi et al. (2013)
Microalgae			
<i>S. platensis</i> FACHB 904	45/25	Increase of the growth rate and the carbohydrate content	Fang et al. (2013)

Appl Microbiol Biotechnol

Reference

%	Wang et al. (2010)
radiation	Hua et al. (2010)
hat	
%	Xia et al. (2010)
.5 %	Wang et al. (2011)
	Lu et al. (2011)
	Guo et al. (2011)
sine	Zong et al. (2012)
	Li et al. (2012)
6	Zheng et al. (2013)
	Liu et al. (2013)
	Jiang et al. (2014)
	Xu et al. (2011)
	Jin et al. (2011)
	Qi et al. (2013)
	Fang et al. (2013)

Atmospheric and room temperature plasma (ARTP) as a new powerful mutagenesis tool

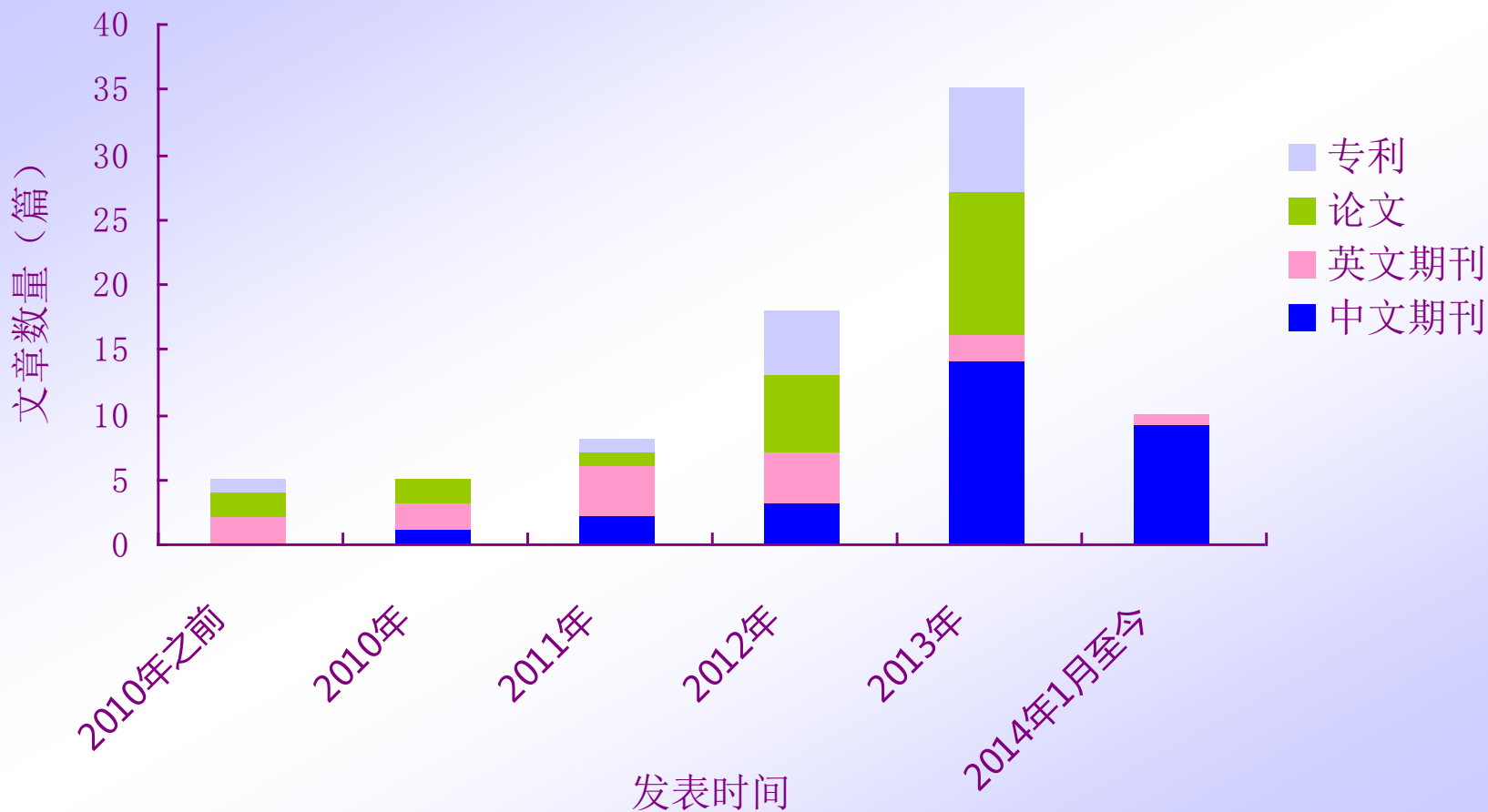
Appl Microbiol Biotechnol DOI 10.1007/s00253-014-5755-y

# 科研产出



截止到2014年8月，已发表相关SCI文献15篇，中文期刊论文55余篇，相关专利13篇。

## ARTP相关文章发表数量趋势



# 文献列表



1. Electrical Features of Radio-frequency, Atmospheric-pressure, Bare-metallic-electrode Glow Discharges , Plasma Chemistry and Plasma Processing , 27(5)2007
2. Genetic effects of radio-frequency, atmospheric-pressure glow discharges with helium , Applied Physics Letters , 92(22)2008
3. One-Dimensional Modeling on the Asymmetric Features of a Radio-Frequency Atmospheric Helium Glow Discharge Produced Using a Co-Axial-Type Plasma Generator , Plasma Chemistry and Plasma Processing , 32(4)2012
4. Manipulation of lipase activity by the helium radio-frequency, atmospheric-pressure glow discharge plasma jet , Plasma Processes and Polymers , 8(3)2011
5. Novel mutation breeding method for *Streptomyces avermitilis* using an atmospheric pressure glow discharge plasma , Journal of Applied Microbiology , 108(3)2010
6. A salt tolerant *Enterobacter cloacae* mutant for bioaugmentation of petroleum and salt contaminated soil , Biochemical Engineering Journal , 49(2)2010
7. Strain improvement for enhanced production of cellulase in *Trichoderma viride* , Applied Biochemistry and Microbiology , 47(1)2011
8. Characteristics of hydrogen production of an *Enterobacter aerogenes* mutant generated by a new atmospheric and room temperature plasma ( ARTP ) , Biochemical Engineering Journal , 55(1)2011
9. *Clostridium beijerinckii* mutant obtained by atmospheric pressure glow discharge producing high proportions of butanol and solvent yield , Biotechnology Letters , 33(12)2011
10. A new mutation breeding method for *Streptomyces albulus* by an atmospheric and room temperature plasma , African Journal of Microbiology Research , 6(13)2012
11. Studies on the physical characteristics of the radio-frequency atmospheric-pressure glow-discharge plasmas for the genome mutation of *Methylosinus trichosporium* , Plasma Science , 40(11)2012
12. Genome shuffling of *Trichoderma viride* for enhanced cellulase production , Annals of Microbiology , 62(2)2012
13. An engineering *Escherichia coli* mutant with high succinic acid production in the defined medium obtained by the atmospheric and room temperature plasma , Process Biochemistry 2013
14. Novel mutant strains of *Rhodospiridium toruloides* by plasma mutagenesis approach and their tolerance for inhibitors in lignocellulosic hydrolyzate , Journal of Chemical Technology and Biotechnology 2013
15. Atmospheric and room temperature plasma(ARTP) as a new powerful mutagenesis tool , Appl Microbiol Biotechnol , Online ISSN1432-0614 2014



## 中文期刊

1. 大气压辉光放电低温等离子体诱变选育谷氨酰胺酶高产菌株，微生物学通报，37(11)
2. 常压室温等离子体快速诱变产油酵母的条件极其突变株的特性，生物工程学报，27(3)
3. 丁醇高产菌株诱变育种及发酵条件优化研究，中国酿造，2011(5)
4. 疏棉状嗜热丝孢菌耐热脂肪酶在无孢黑曲霉中的重组表达，食品工业科技，33
5. 常压室温等离子体非转基因生物诱变木糖代谢产油酵母的方法及特性研究，食品科学，33
6. 高产琥珀酸菌株的等离子体诱变选育，南京工业大学学报，35(1)
7. 等离子体诱变凝结芽孢杆菌提高木糖利用能力高产L-乳酸，食品科学
8. 常压室温等离子体快速诱变筛选高脯氨酸产率突变株，食品与发酵工业，39(1)
9. 常压室温等离子体快速诱变绿色糖单孢菌筛选木聚糖酶高产菌株及其酶学性质研究，微生物学通报，40(5)
10. 磷脂酶A1高产菌株的筛选及其等离子体诱变，中国生物制品学杂志
11. 食品微生物育种新技术——常压室温等离子体微生物基因组快速突变技术的开发难点和育种优势，乳业科学与技术，36(1)
12. 新型常压室温等离子体(ARTP)快速诱变高产苏氨酸的突变株，现代食品科技，29(8)
13. L-苏氨酸工业研究进展，广东饲料，21(12)
14. 常压室温等离子体诱变高效利用木糖产丁二酸菌株，生物工程学报，29(11)
15. 常压室温等离子体诱变选育高产香兰素菌株，食品与发酵工业，39(10)
16. 基于常压室温等离子体技术诱变选育D-乳酸高发酵速率菌株，食品工业科技
17. 基因组改组选育产酯化酶地衣芽孢杆菌，中国生物工程杂志，33(8)
18. 耐碱性木聚糖酶，微生物学通报，40(5)
19. 常压室温等离子体快速诱变酒精酵母及其突变株的特性研究，中国酿造，32(10)
20. 大气压射频辉光放电等离子体射流工业微生物诱变育种研究进展，第十六届全国等离子体科学技术会议
21. 基因组改组选育磷脂酶A1生产菌，中国生物工程杂志，33(10)
22. 常压室温等离子体诱变筛选高乳糖酶活力酵母的研究，中国食品学报，14(2)
23. 等离子体-紫外复合诱变选育四羟基环孢菌素衍生物高产菌株，微生物学杂志，34(1)
24. 基于核糖体工程理论的常压室温等离子体诱变筛选多杀菌素高产菌，中国生物工程杂志，34(1)
25. 高抗逆高丁比拜氏梭菌的选育及其性能考察，生物加工过程，12(1)
26. 常压室温等离子体(ARTP)生物诱变育种及其应用研究进展，化工学报
27. 对金黄色葡萄球菌有拮抗作用的植物乳杆菌的诱变选育，重庆理工大学学报(自然科学)，28(4)
28. 等离子体诱变选育柠檬酸高产菌，天津科技大学学报，29(1)
29. 生长速度快且油脂产率高的湛江等鞭金藻诱变株的筛选，微生物学通报
30. 等离子体技术在弗氏链霉菌和侧耳属诱变选育中的应用，中国兽药杂志，48(6)
31. 夫西地酸生产菌复合诱变育种及发酵培养基的优化研究，化学与生物工程，31(6)

# 文献列表

修改备注：  
新增的



## 学位论文

1. 产乳酸耐高温凝结芽孢杆菌的诱变及进化选育, 华东理工大学, 硕士论文
2. 低嘌呤啤酒生产菌株的选育及发酵工艺优化, 华东理工大学, 硕士论文
3. 产鼠李糖脂菌株的选育及其发酵条件的优化, 齐鲁工业大学, 硕士论文
4. 木糖制备乳酸高产菌的诱变选育和工艺优化, 南京林业大学, 硕士论文
5. 裂殖壶菌产DHA的发酵工艺研究及高产菌株选育, 江南大学, 硕士论文
6. 常压室温等离子体快速诱变绿色糖单孢菌筛选木聚糖酶高产菌株及其酶学性质研究, 北京林业大学, 硕士论文
7. 硫酸多粘菌素B菌种选育与发酵工艺的研究, 北京化工大学, 硕士论文
8. 多杀菌素高产菌株的诱变选育及快速筛选方法的研究, 华南理工大学, 硕士论文
9. 玉米芯半纤维素水解液发酵法生产木糖醇的研究, 北京化工大学, 硕士论文
10. 鼠李糖脂高产菌株诱变筛选、遗传改造及关键酶的异源表达, 山东大学, 硕士论文
11. Blakesleatrispora发酵法制备番茄红素的研究, 北京化工大学, 硕士论文
12. 盐霉素高效生产菌种的高通量选育, 华东理工大学, 硕士论文
13. 高产率生产L-乳酸拟干酪乳杆菌的高通量选育方法建立及应用, 华东理工大学, 硕士论文
14. 固态发酵纤维素酶的研究, 中国科学院大学, 博士论文
15. 降低酿造蒸馏酒中甲醇生产量的研究, 华南理工大学, 硕士论文
16. 降低甘蔗蒸馏酒中甲醇生产量的研究, 华南理工大学, 硕士论文
17. 红法夫酵母生产虾青素的研究, 北京化工大学, 硕士论文
18. 黑曲霉大麻脱胶工艺与诱变育种的研究, 山东大学, 硕士论文
19.  $\beta$ -葡萄糖苷酶高产菌株Peni-1的产酶优化、菌株改造及应用研究, 山东大学, 硕士论文
20. 耐碱性木聚糖酶生产菌株ZCF58的诱变及其creA基因的克隆与敲除, 山东大学, 硕士论文
21. 常压室温等离子体快速诱变微藻和产油酵母及其组学分析研究, 清华大学, 博士论文
22. 凝乳酶高产菌株的诱变选育及其发酵条件、产物酶学活性的相关研究, 北京化工大学, 硕士论文
23. 耐盐阴沟肠杆菌的选育及其在油盐污染土壤修复中的应用, 清华大学, 博士论文
24. 常压室温等离子体对微生物的作用机理及其应用基础研究, 清华大学, 博士论文

# 文献列表

修改备注：  
新增的

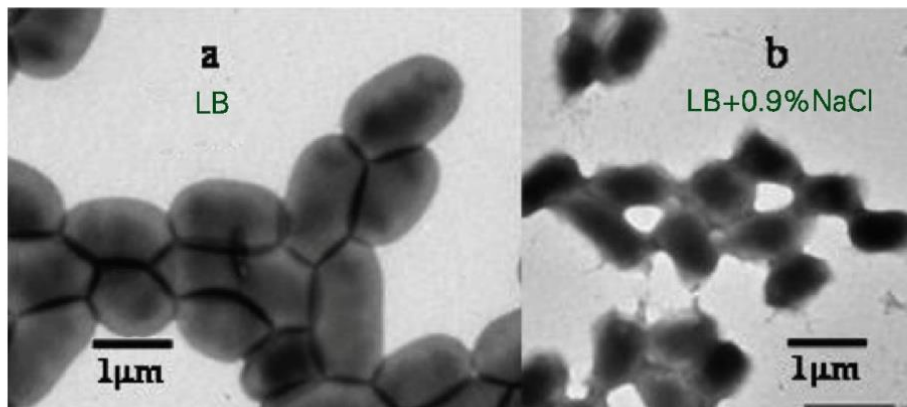


## 专利

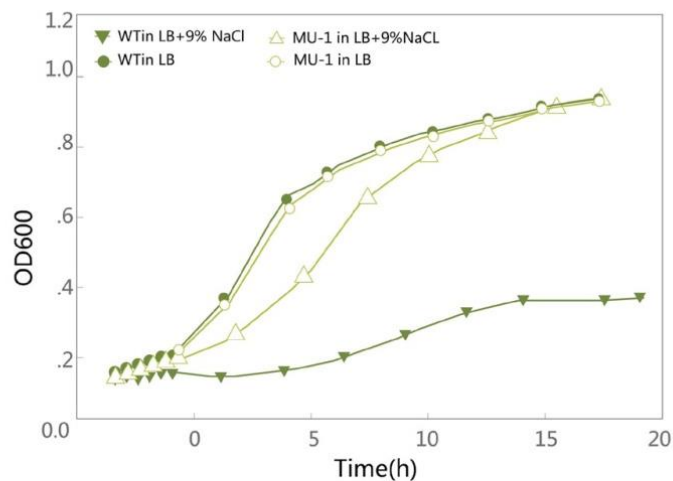
1. 一株高产雷帕霉素的游动放线菌诱变菌株，201310728024.4，天津北洋百川生物技术有限公司
2. 一种利用常压室温等离子体制备微生物感受态细胞的方法，201310700136.9
3. 一株高阿魏酸抗逆性拜氏梭菌及其应用，201310676856.6，，南京工业大学
4. 一株铵根离子耐受型产丁二酸大肠杆菌及其应用，201310279778.6，南京工业大学
5. 一株厌氧利用合成培养基高产丁二酸大肠杆菌的筛选及其应用，201310288669，南京工业大学
6. 一株厌氧利用合成培养基高产丁二酸大肠杆菌的筛选及其应用，201310288538.2，南京工业大学
7. 一种盐霉素高产菌株，201210589200.6，浙江升华拜克
8. 一株大肠埃希氏菌LL016 及其应用，201210515218.1，南京工业大学
9. 产琥珀酸放线杆菌菌株YH123及其应用，201210122717.4，南京工业大学
10. 利用合成培养基纯厌氧生长产丁二酸的大肠杆菌及其应用，201210138292.6，南京工业大学
11. 一种耐温型产碱杆菌及其在威兰胶生产中的应用，201210086289.4，南京工业大学
12. 一株高丁醇比贝氏梭菌及其应用，201110020105.X，南京工业大学
13. 一株发孢甲基弯菌及其应用，200710175425.6，清华大学

# 案例一：提高 *E. cloacae* 耐盐和降解石油烃 (TPH) 的能力

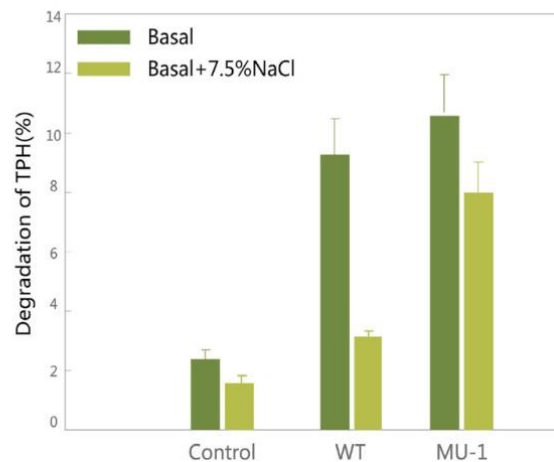
## Case I: *Enterobacter cloacae*



*E. cloacae* 的电镜图片  
(a) 野生型菌株;  
(b) 突变菌株。  
TEM of *E. cloacae*  
(a) Wild and (b) Mutant.



从生长曲线可以看出，突变菌株对培养基中的盐有很高的耐受性，而野生型菌株在含盐培养基上几乎无法生长。From the growth curve, the mutant exhibited its high tolerance to medium with high salt, while the wild strain almost can not grow with salt.

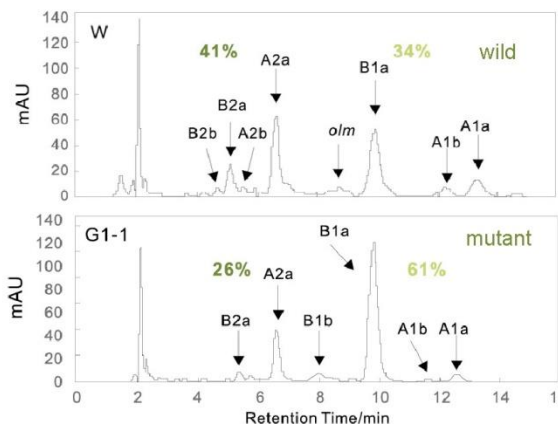
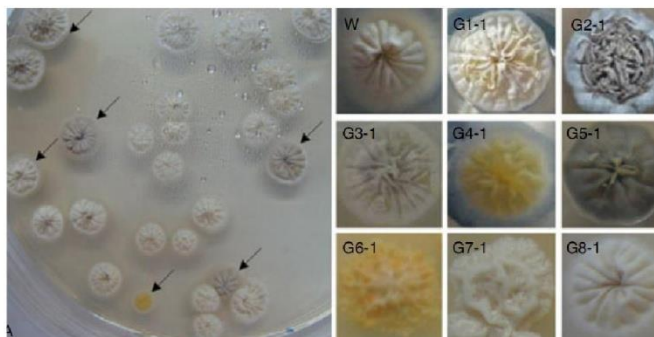


培养 12 天后，突变菌株对 TPH 的降解能力远高于野生型菌株 *E. cloacae*，尤其在高盐环境中。After 12 days of cultivation, the ability TPH's degradation of mutant is much higher than that of the wild-type, especially in high-salt environment.



# 案例二：提高 *S. avermitilis* 阿维菌素 B1a 的产量

## Case II: *Streptomyces avermitilis*



*S. avermitilis* 被 ARTP 处理后产生的具有不同形态的突变株。根据形态对突变菌株进行分类，分别表现出不同的发酵特性。

Diverse colony morphologies of *S. avermitilis* after treated by ARTP .

突变株的 B1a 产量大大提高，且占总阿维菌素的比列 (61%) 远远高于野生型菌株 (34%)。The mutant show its high yield of B1a, and its B1a's ratio to total avermectin (61%) is more higher than the wild's (34%).

Group	Colony number	NO.	R <sub>B1a</sub> *	R <sub>Total</sub> *	α(%) <sup>†</sup>
G1	7	W	1.00±0.09	1.00±0.07	39.1
		G1-1	1.43±0.22	1.18±0.09	47.4
		G1-2	1.37±0.12	1.28±0.12	41.8
G2	11	G2-1	1.16±0.07	1.11±0.04	40.9
		G2-2	1.15±0.12	0.77±0.10	58.4
P	18				
G3	15	G3-1	0.53±0.08	0.37±0.04	56.0
		G3-2	0.35±0.15	0.53±0.11	25.8
G4	12	G4-1	0.66±0.08	0.47±0.05	54.9
		G4-2	0.39±0.07	0.32±0.03	47.7
G5	26	G5-1	0.37±0.04	0.30±0.04	48.2
		G5-2	0.44±0.07	0.40±0.03	43.0
G6	8	G6-1	0.91±0.05	0.92±0.09	38.7
		G6-2	0.44±0.10	0.39±0.04	43.3
G7	7	G7-1	0.05±0.01	0.10±0.02	
		G7-2	0.24±0.12	0.30±0.08	27.3
M	86				
G8	202	G8-1	0.89±0.09	0.97±0.04	42.2
		G8-2	1.02±0.08	1.05±0.10	38.7
T	288				
	R <sub>M</sub> =M/T=30%		R <sub>V</sub> =P/T=21%		

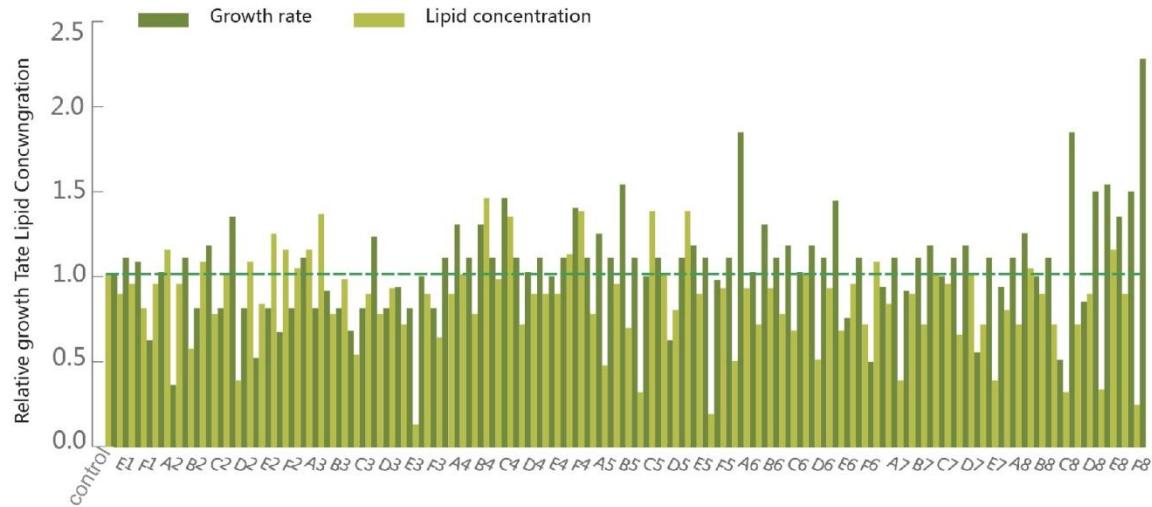
\*R<sub>B1a</sub> and R<sub>Total</sub> represent the percentage content of the mutant's Y<sub>B1a</sub> and Y<sub>Total</sub> to those of the wild strain(w), respectively.  
<sup>†</sup>α indicates the ratio of Y<sub>B1a</sub> and Y<sub>Total</sub>

根据形态对突变菌株进行分类，分别表现出不同的发酵特性

The mutants, classified by colony's morphologies, show their different fermentation ability.

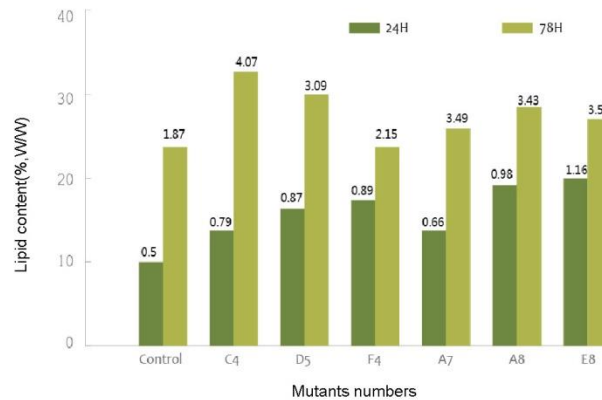
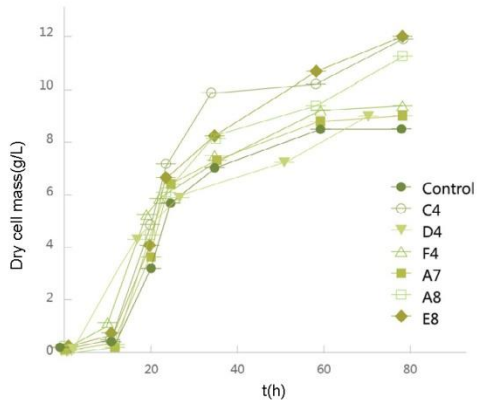
# 案例三：提高 *R.toruloides* 的产油脂能力

## Case III: *Rhodosporidium toruloides*



图中显示 44 个突变体和野生菌株在培养 48 小时后生长速率和脂质浓度的相关数据，从数据可以看出超过 30% 的突变体表现出更好的发酵活性和更高的生长速率。

From the figure of the relative growth rates and lipid concentrations of the 44 mutants compared with original strain (incubation for 48h), more than 30% of mutants exhibit their better fermentation ability and faster growth rate.

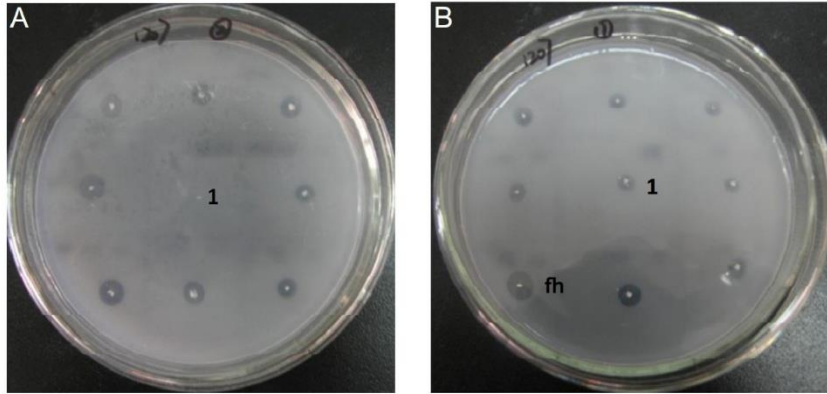


经四代筛选后，突变株仍表现出比野生型更高的生长速率和更高的油脂产量。

After 4 generation, the mutants still show their higher growth rate and higher yield of lipid compared with wild strain.

# 案例四：结合分子生物学技术提高 *A.niger* 产脂肪酶的比活力

## Case IV: *Aspergillus niger*



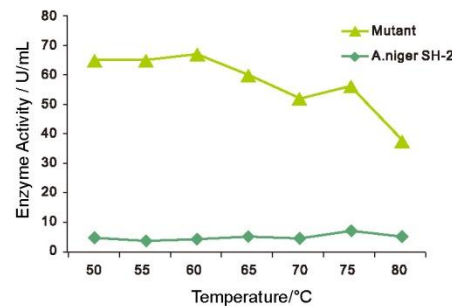
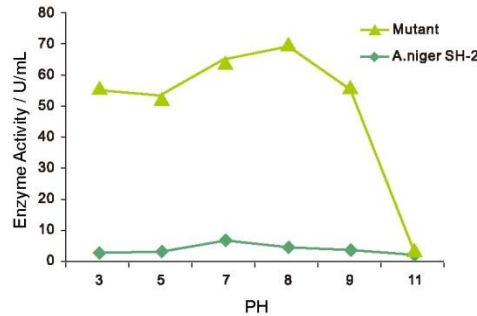
*A.niger* 及其转化子经 ARTP 处理之后表现出较高的产酶能力。图中中间的 1 表示出发菌株，周围为突变株。

After treated by ARTP, the mutants of *A. niger* show their higher activity of lipase. The "1" is the control, and the surrounding ones are mutants.

纯化后转化子、突变株 tll 蛋白浓度、酶活力及酶的比活力

Protein concentration and enzyme specific activity of tll after purification

Samples	Concentration of protein(mg/mL)	Enzyme specific activity(U/mg)
转化子transformant	0.76	47.4
突变株mutant	0.54	64.8



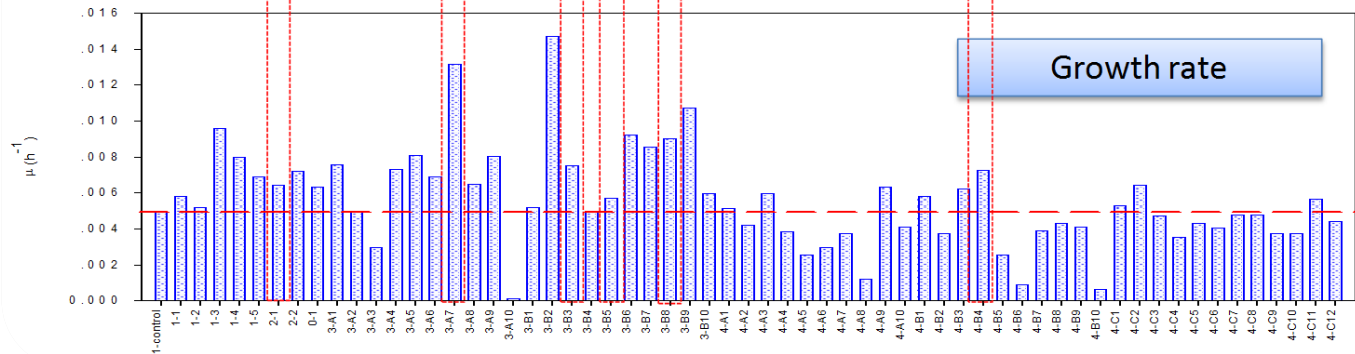
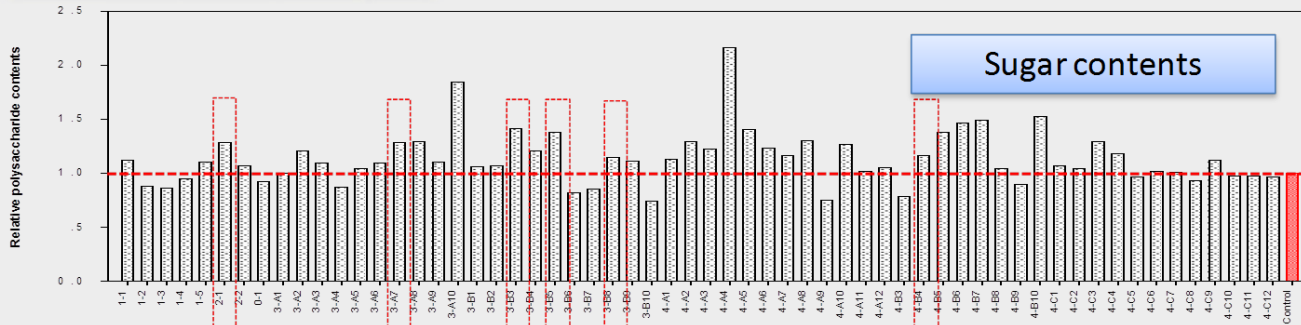
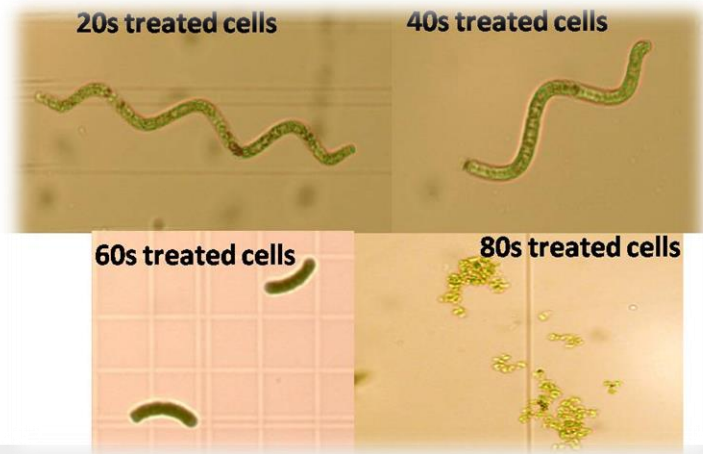
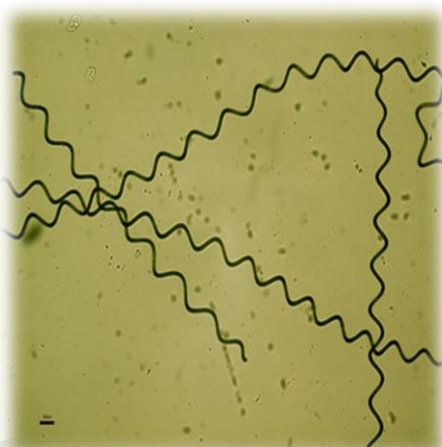
突变菌株的脂肪酶有很强的耐 pH 及温度的能力。The lipase activity of mutants showed a strong resistance to pH and temperature.

# 案例5 构建 *S. platensis* 突变体库及选育高糖产量的突变株



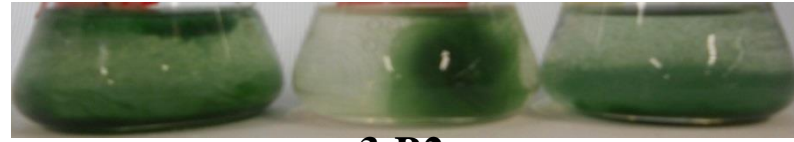
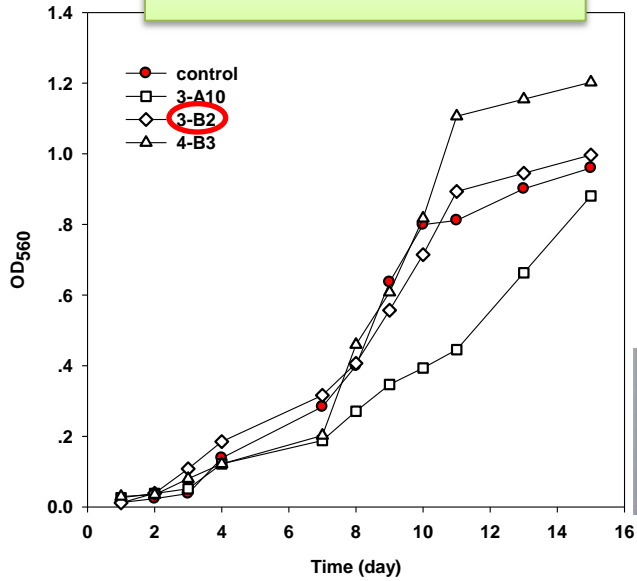
Before treatment

After treatment



# Phenotypes of representative mutants

## Growth rate



Control

3-B2

3-A10



4-B3



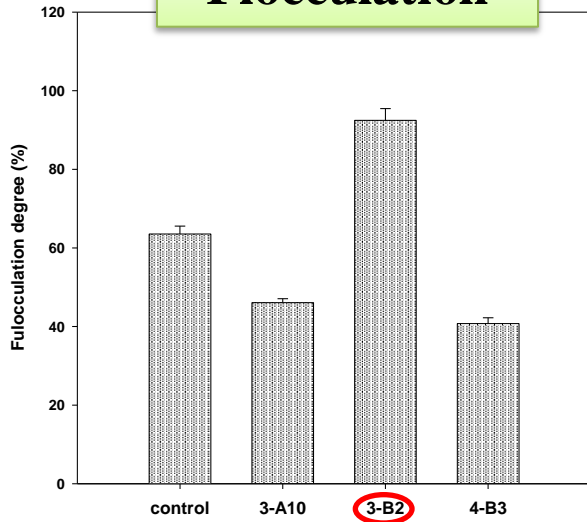
Control 静置培养

3-A10 静置培养

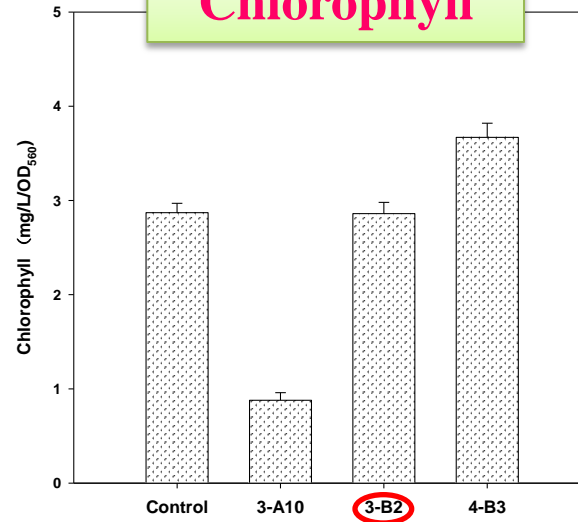
3-B2 静置培养

4-B3 静置培养

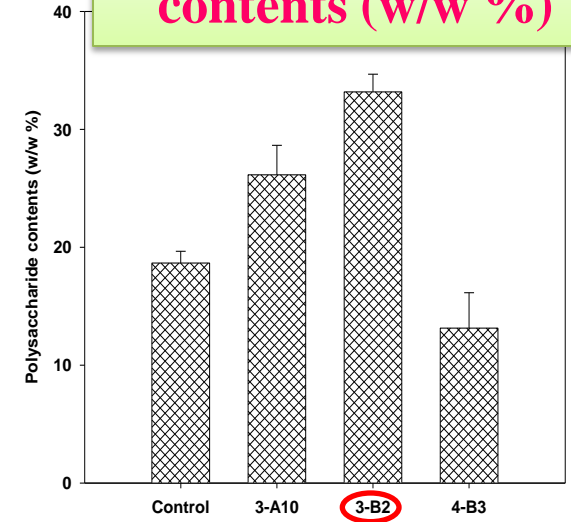
## Flocculation



## Chlorophyll



## Polysaccharide contents (w/w %)





# Genomic analysis of the mutants

**Genome preparation**

**Genome resequencing**

**Mapping**

**SNP, DIP Detection**

**ANNOTATION**

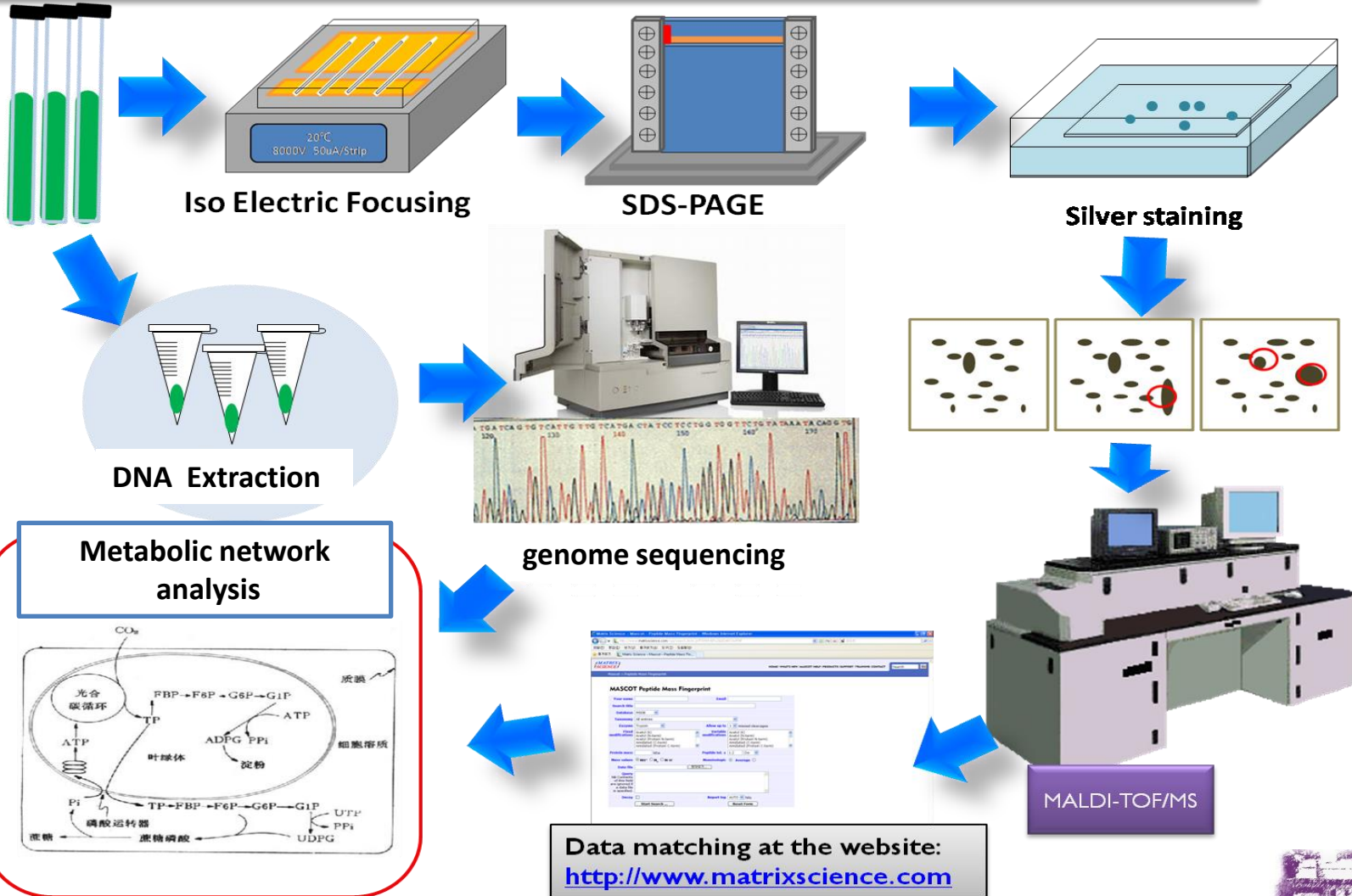
Variation	Control	3-A10	3-B2	4-B3
SNP	239423	239424	237828	239447
SNP compare filter Control	–	2912	2330	2934
Non-synonymous SNP filtered Control	–	1033	839	1044
DIP	7916	7895	7789	7911
DIP compare filter Control	–	443	458	464
Non-synonymous DIP filtered Control	–	232	210	232

**SNP: Single Nucleotide Polymorphisms(单核苷酸多态性)**

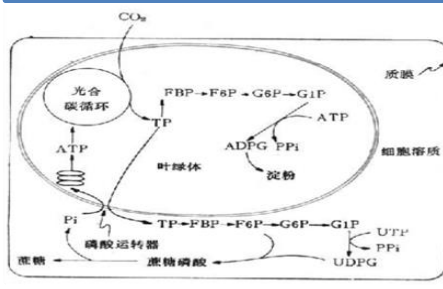
**DIP: Inserts and deletes nucleotides from a sequence**

**Non-synonymous SNP: SNP with altered amino acids**

# Omics analysis of the mutants

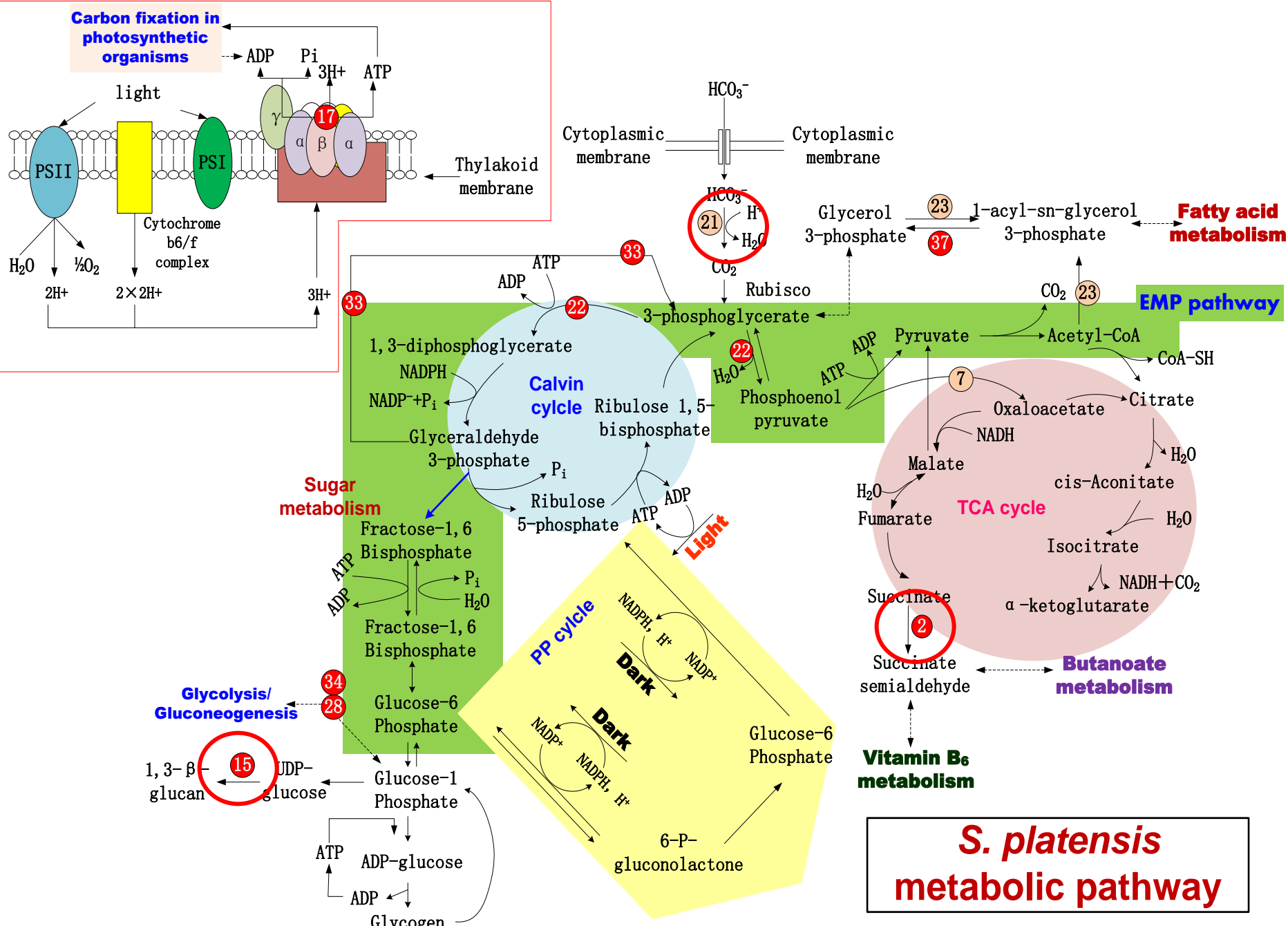


Metabolic network analysis



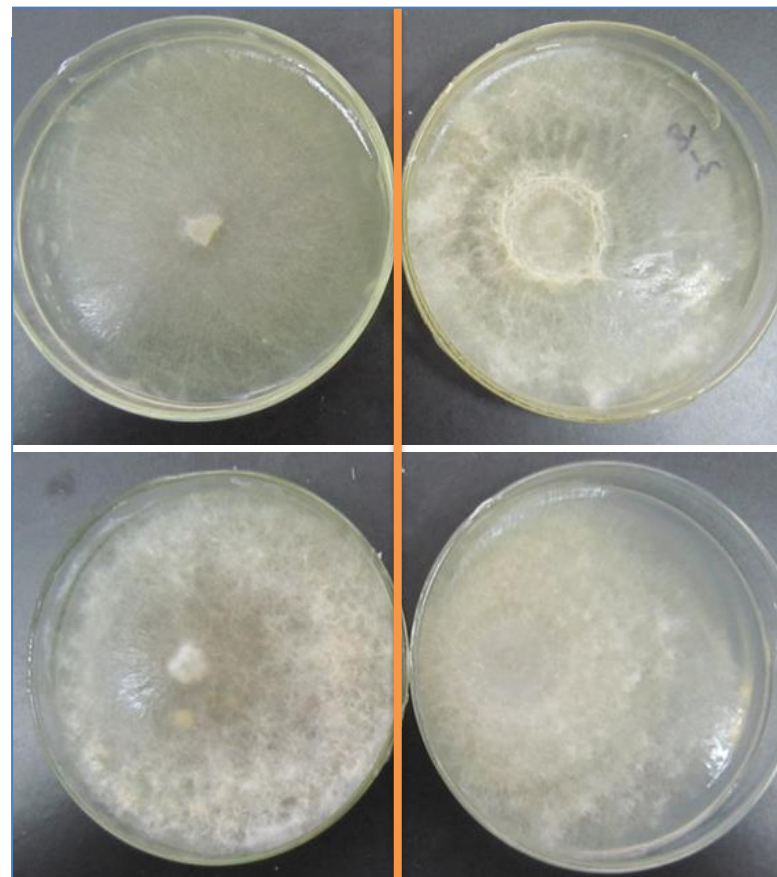
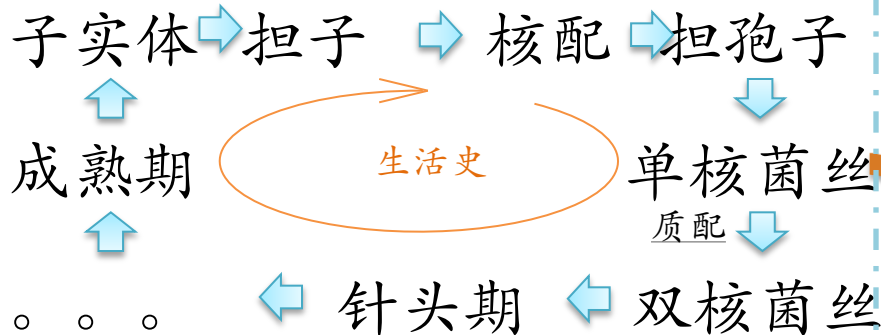
Data matching at the website:  
<http://www.matrixscience.com>





# 应用实例六：ARTP诱变担子菌 *Volvariella volvacea* (草菇) 形态变化

食用菌（担子菌）的主要育种手段包括：  
自然选择、诱变育种、杂交育种和分子生物学育种。



Wild type

Mutants

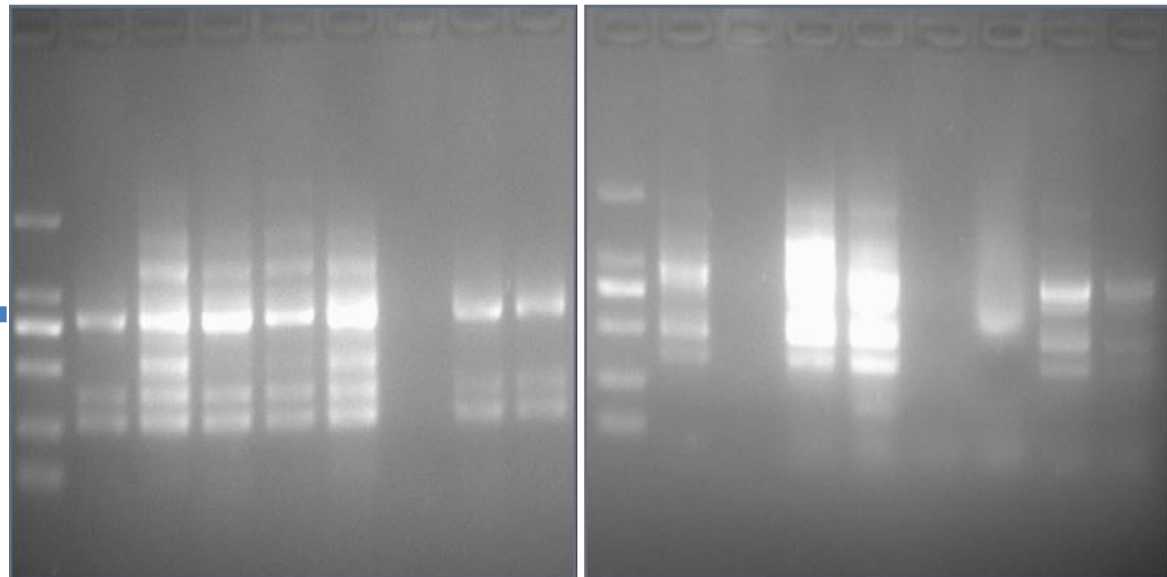
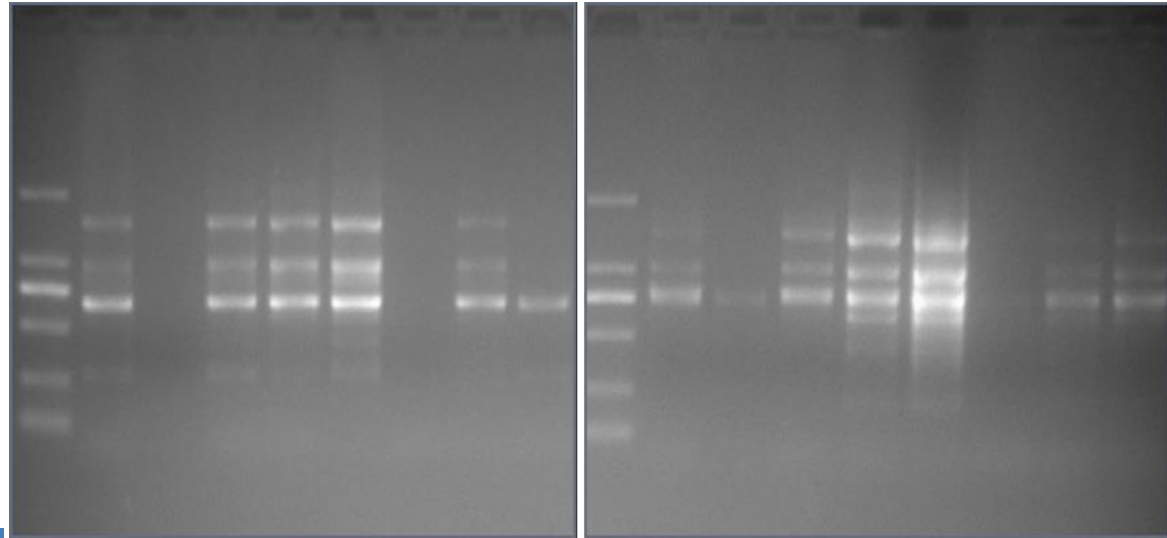
菌丝体 ← 再生 ← 原生质体



# *Volvarella volvacea* (草菇)

## 诱变株的RAPD分析

M V<sub>23</sub> 1 2 3 4 5 6 7 M V<sub>23</sub> 1 2 3 4 5 6 7



**RAPD** 随机扩增多态性分析  
(Random Amplified Polymorphic DNA)

RAPD多用于食用菌细胞融合菌株的遗传鉴定；也用于食用菌育种材料的早起选择和外源导入基因的追踪。

如右图可见：

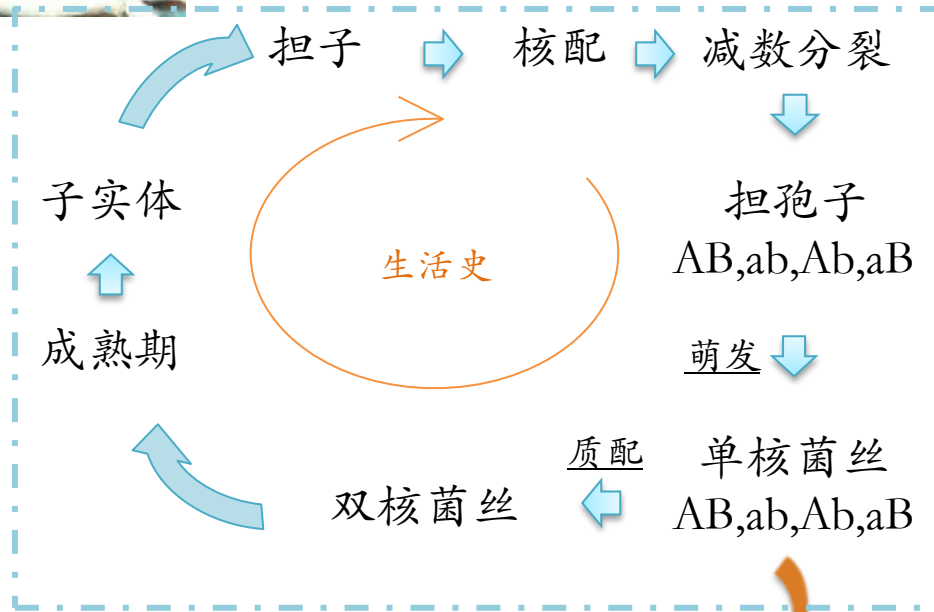
ARPT所得突变株相比于出发菌株，其DNA发生了明显的变化。

**M** : Marker

**V<sub>23</sub>** : Wild type strain

**1~7** : Mutants

# Pleurotus ostreatus (平菇) ----形态变化



菌丝体



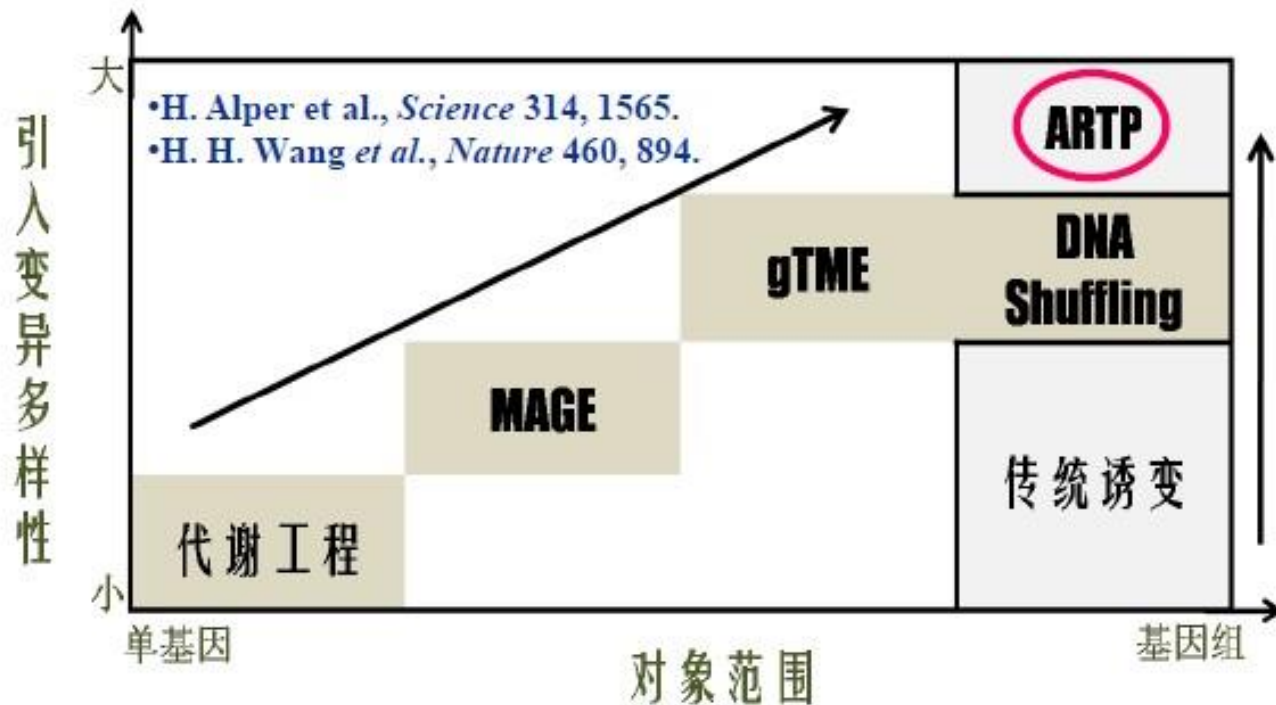
Wild type

Mutants

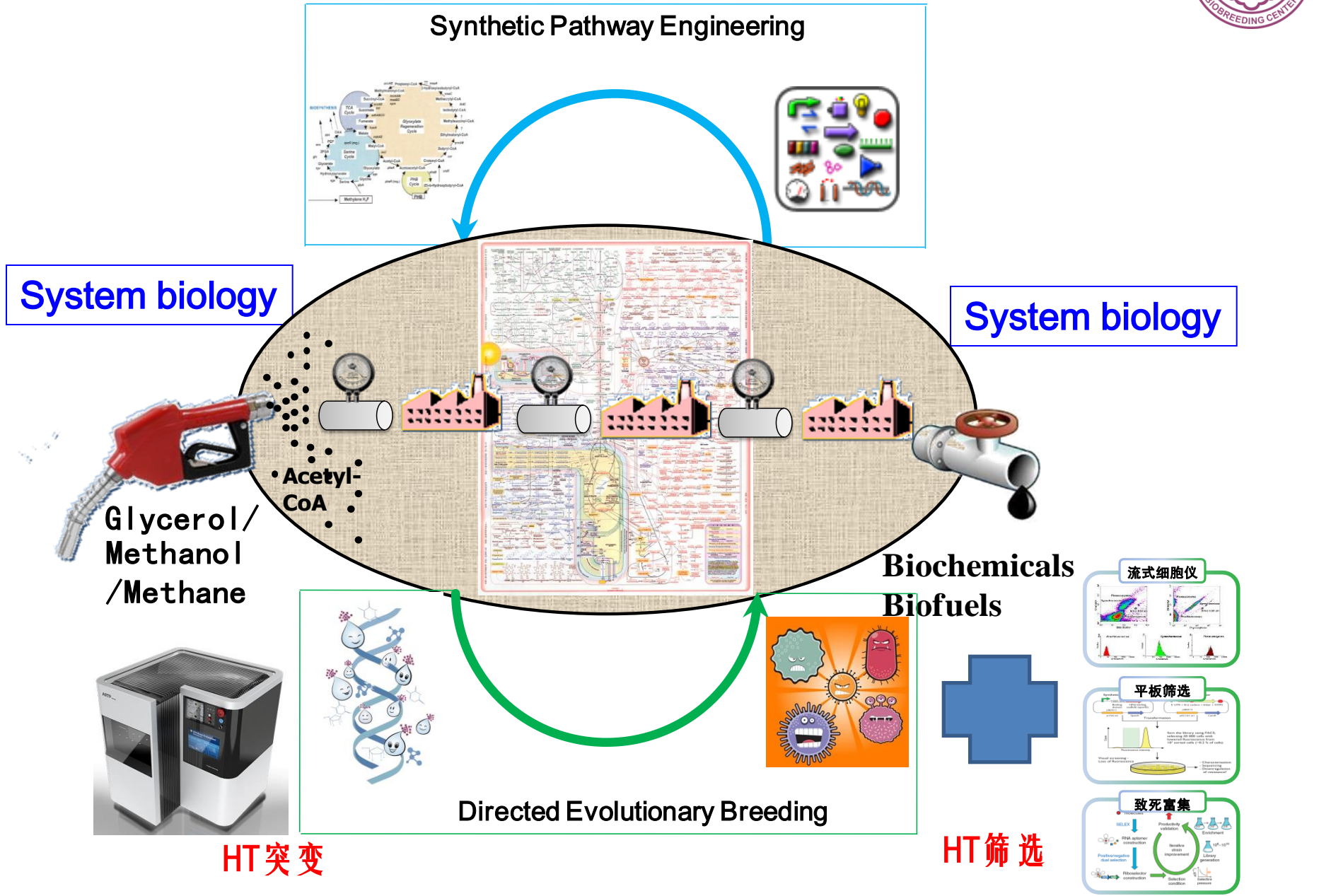


# 总结

- 高效微生物进化育种技术是发酵生物技术发展的关键技术，对发酵产业进步具有重要意义。
- ARTP 具有操作简便、诱变速度快、突变多样性大、能构建大库容突变库，是非GMO微生物进化育种的有效方法，具有应用推广价值。
- 和系统生物学及代谢工程结合，ARTP是开发系统改造发酵微生物的方法和技术的平台。



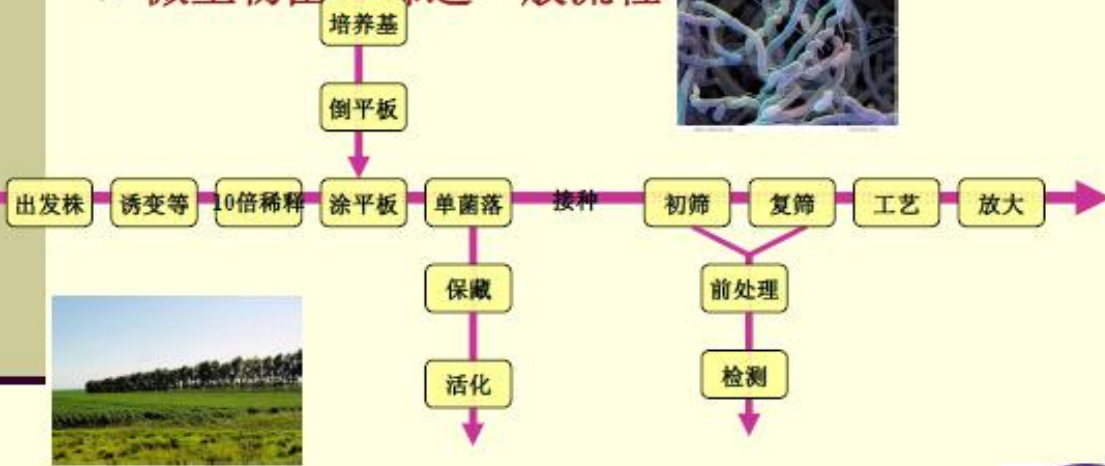
# 核心技术之二：高效率筛选



# 解决方案



## 微生物菌种筛选一般流程



高通量筛选，本质是  
高通量初筛：  
即从 $10^3$  -  $10^8$ ，缩  
小到 $10^1$ 。

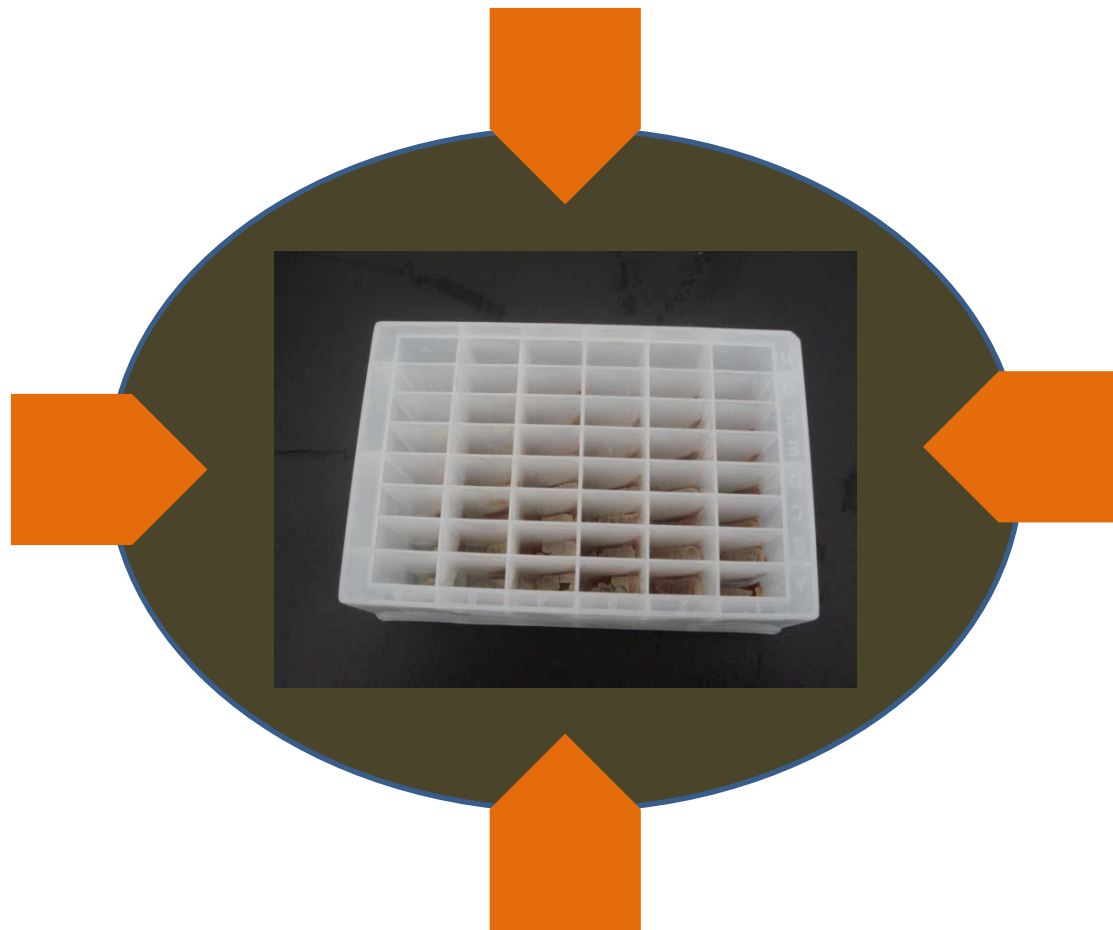
- 一、筛选模型的构建（肉眼可判？简单光谱检测可判？）
- 二、高通量方法：
  1. 基于设备集成化的（天津工生所、华东理工）
  2. 基于设备小型化的。
    - (1) 不基于培养特性的单细胞筛选；（FACS、FADS）
    - (2) 基于细胞培养特性的培养液滴筛选；

# 微孔板



单克隆挑选系统、进液系统

高通量  
检测系  
统



高透覆  
膜或通  
氧系统

放大系统。。。。



# 适合的就是最好的！

- 我们的路——

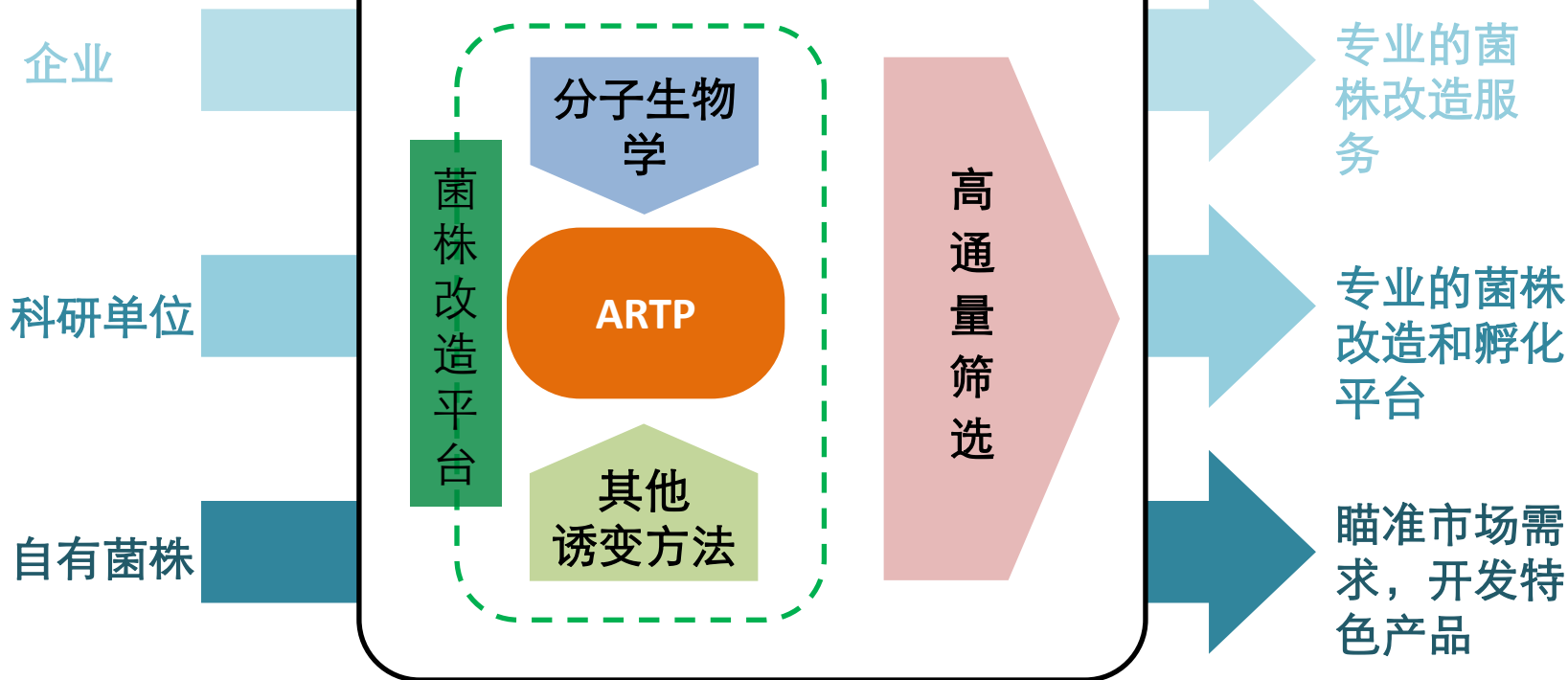
Case by Case!

- 我们的服务理念：

安全、专业、深入



## 生物育种工程中心 提供专业服务



诱变技术服务

菌株改造一体化

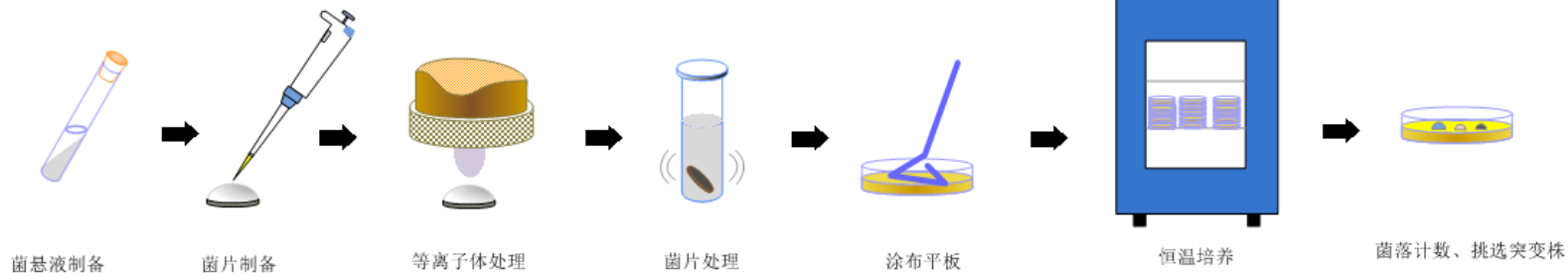
科研合作

人才培养

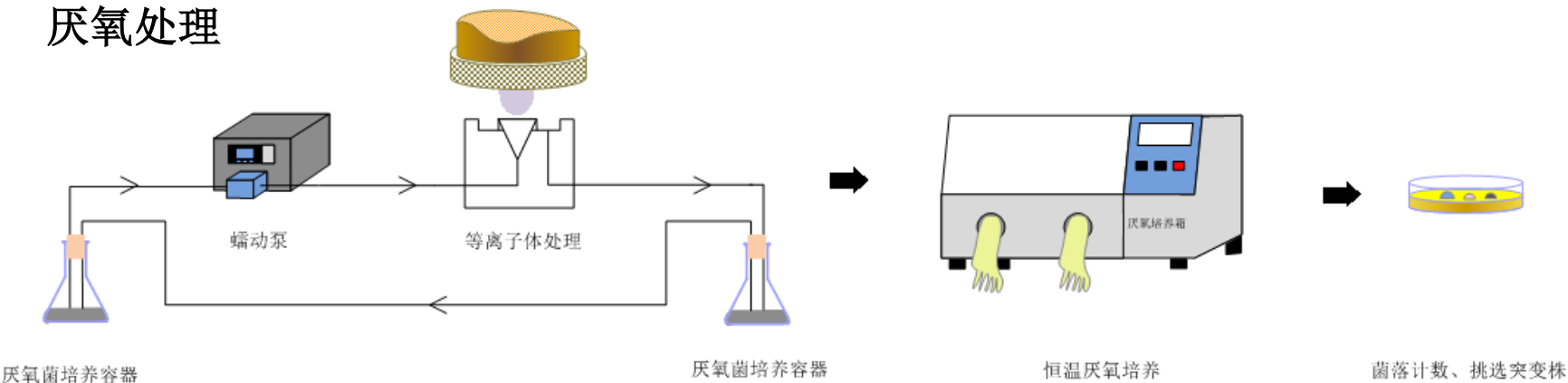
# 灵活的处理



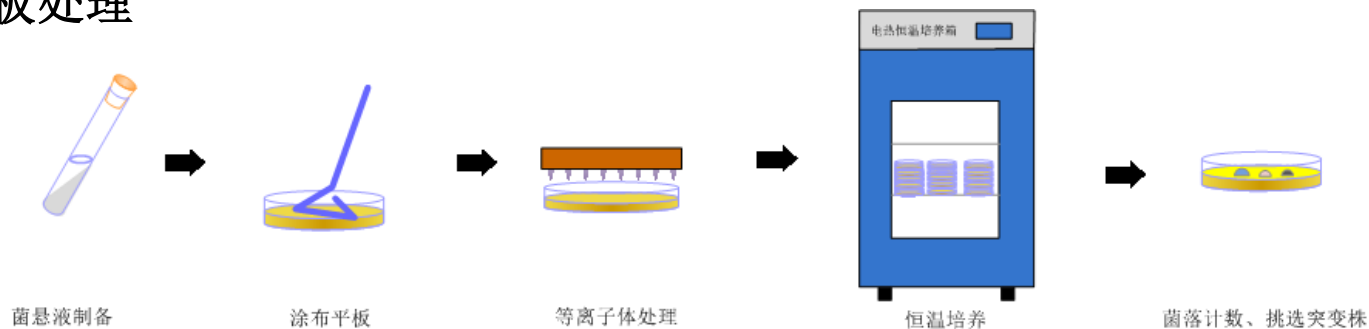
## 单通道处理



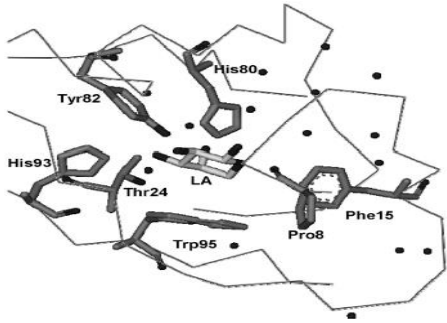
## 厌氧处理



## 平板处理

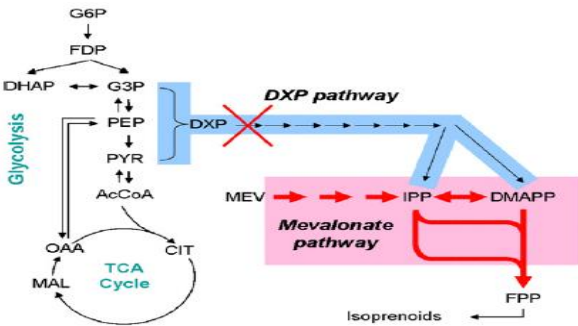
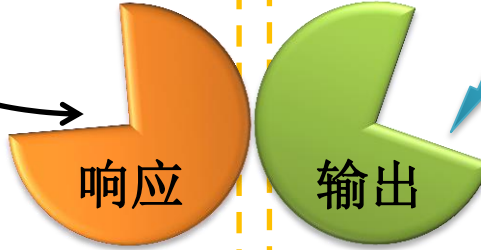


# 服务模式之----- 高效筛选模型的构建

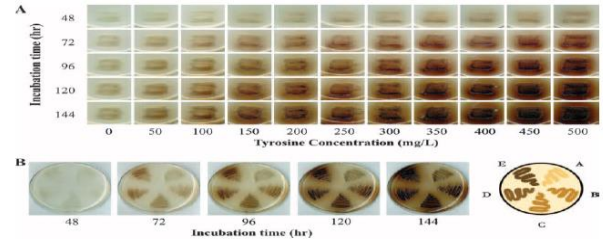


基于分子识别

metabolite

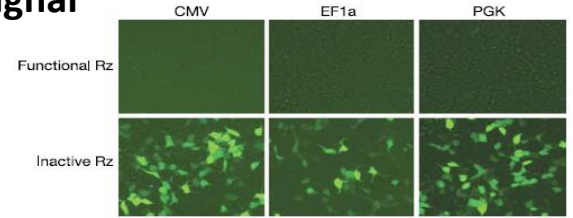


基于进入代谢途径

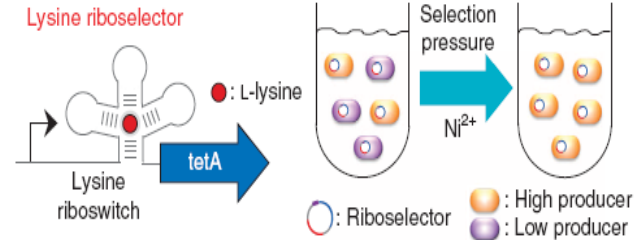


基于代谢物颜色或颜色反应

signal



基于荧光



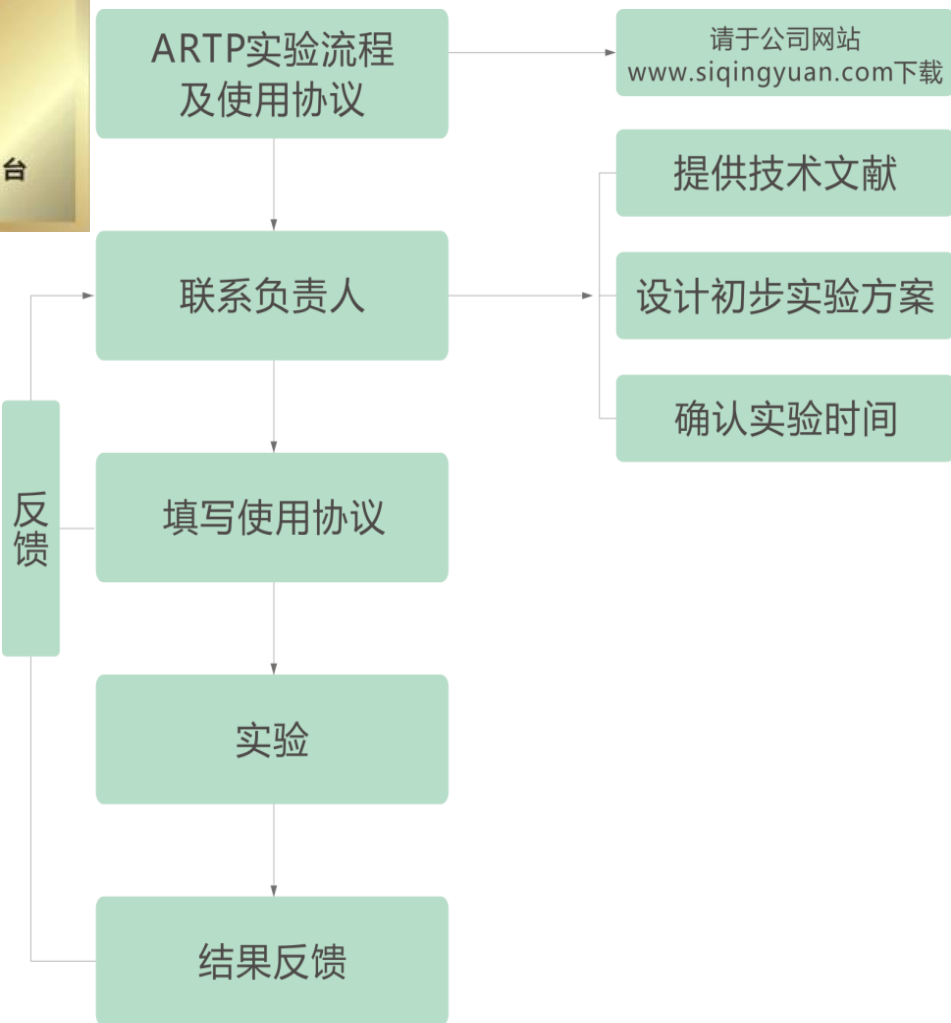
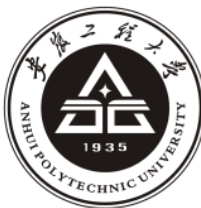
基于生长优势或致死

Santos, C. N. S.; Stephanopoulos, G., *Applied and Environmental Microbiology* **2008**, 74 (4), 1190-1197.

Tang, S.-Y.; Cirino, P. C., *Angew. Chem.* **2011**, 50 (5), 1084-1086. Pfleger, B. F. et al., *Metabolic Engineering* **2007**, 9 (1), 30-38.

Yang J et al., *Nature Communication* **2013**, 4, 1413-1418.

# 服务模式之----- 共建平台，诱变处理服务



# 服务模式之----

## 承担科研任务，共同申请项目或课题

广东某大学---蛋白酶高产菌株的选育

服务方式:

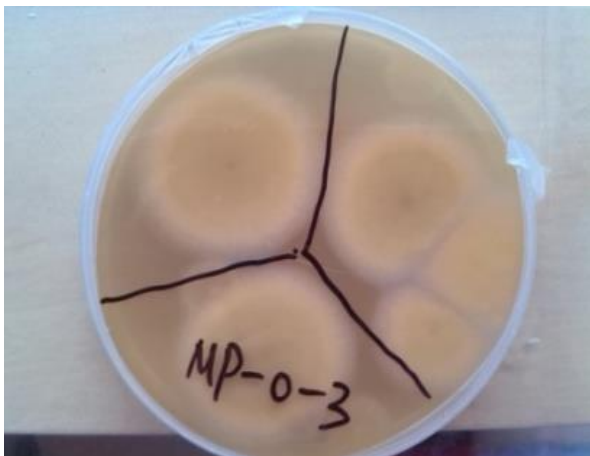
甲方提供 (菌物、培养基、实验方法、评价方法)

思清源: 多种方法的诱变处理

随时沟通实验结果

每周小结

双方同步培养, 鉴定。



前



后

霉菌



降低科研成本，提高科研效率！



**顶天** 前沿技术,勇于创新

**立地** 扎根产业,专业服务

**树人** 人才培养,全方位提升生物产业  
核心竞争力





## 服务模式

### 生物诱变技术服务

运用自主研发的高效常压室温等离子体诱变技术，为企业或科研单位提供专业的诱变技术服务；

### 菌株改造一体化服务

高素质的服务人员、规范的服务流程、高科技的研究装备、保密措施完善的单元式研究平台，保障用户菌株安全；结合诱变技术或分子生物学技术及清华大学的科研实力，为用户提供从前期诱变到后期小、中试育种的菌株改造一体化服务；

### 高效筛选模型的构建

为用户定制高效筛选模型，突破诱变育种技术中的筛选瓶颈，大幅度提高育种效率；

### 科研项目合作

为用户提供前端科研服务，降低科研风险，节约科研成本，提高科研效率；与企业或科研单位展开科研合作，共同申请课题或承担项目；

### 生物技术与产品的孵化服务

对有良好的应用前景的生物新技术或新产品，从资金、技术提升、市场推广等多个角度进行孵化；

### 人才培养

对企业核心技术人员进行培训，从根本上提升产业的核心竞争力。



- 基于单元化操作的安全性与私密性
- 高水平实验平台，保证实验顺利进行，有效降低企业研发成本
- 高水平科研队伍，共同参与，即时辅导，提高科研效率

初步了解

保密协议

技术沟通

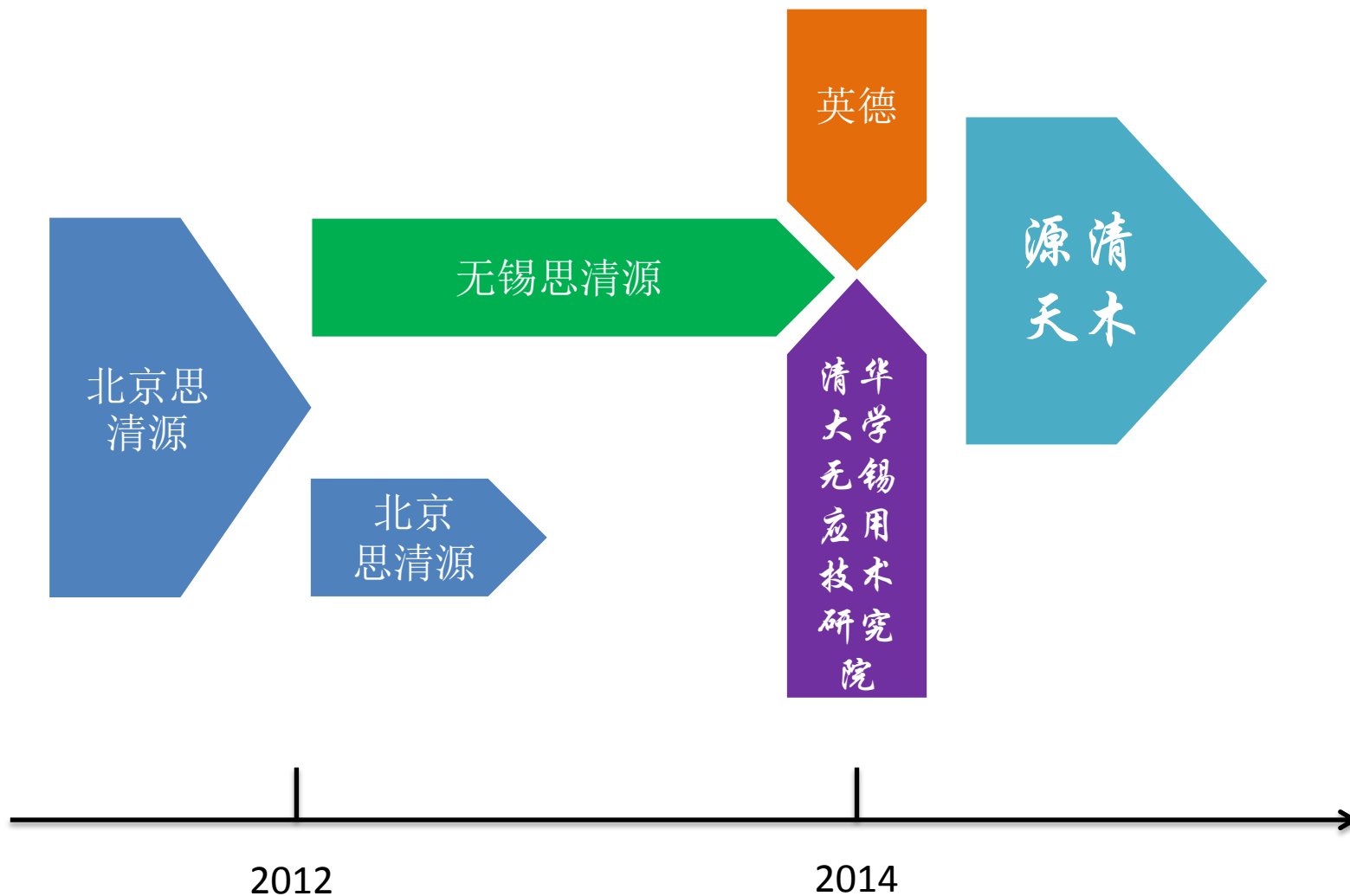
签订协议

实验计划与实施

# 风险共担、合作共赢



# 从思清源到“源清天木”





## 对于目前有人仿冒产品、扰乱市场的行为：

- 提醒科研工作者：

(1) 与别人合作时，请各位老师注意在合作中形成“自己”的品牌；把握产学研合作的主动权。

(2) 合作的人，人品和志同道合很重要；如遇到人品很差的人，合作不成还会伤及家人！

- 提醒企业：

(1) 认准品牌；

(2) 选择产品，即是选择服务。清华大学研究组，为各位围绕设备提供完善、专业的服务。



## ● 王立言

清华大学无锡应用技术研究院生物育种研究中心 常务副主任  
无锡源清天木生物科技有限公司 副总经理

134 7250 2759

wangliyan@tsinghua-wx.org

### 技术服务

- QQ : 255 287 9730

### 技术讨论群

- QQ群 : 280 359 801

谢谢!