

MPMS

多功能等离子体诱变系统



突变类型丰

操作方式简单

营成本低廉

等离子体诱变原理简介

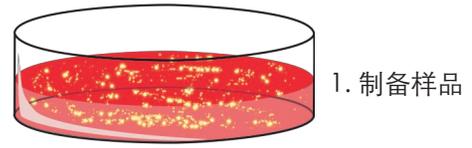
大气压常温等离子体是气体在高压交变电场下产生的非平衡态物质，其成分包括氮正离子、原子态氧、亚稳态氧分子、臭氧和OH自由基等活性物质，同时伴有辐射和电场。这些物理和化学因素能临时改变细胞壁（膜）的通透性。

研究发现，等离子体束流进入细胞后，其活性成分与蛋白质和DNA等生物大分子作用，对DNA片段造成局部损伤，并激发细胞自身的修复机制，从而产生大量随机突变。

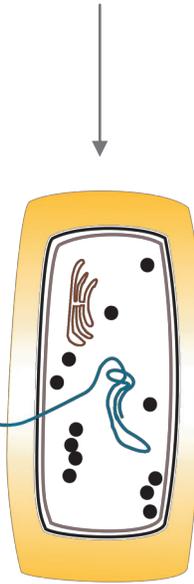
该突变方式对碱基无选择性，能在任何位点产生突变，从而产生种类丰富的变异基因。

由于细胞壁（膜）的通透性改变，其他种类的诱变剂（紫外、化学诱变剂）对细胞的作用也得到增强。

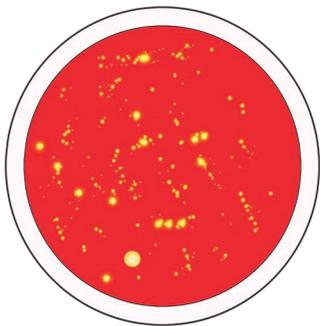
MPMS融合了等离子体、紫外和化学诱变等技术，极大地提高了微生物的突变频率和突变种类。其快速、简单和高效的特点，让您将精力集中于后续的筛选和驯化等过程。



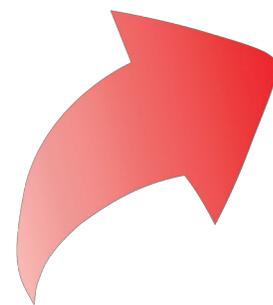
1. 制备样品



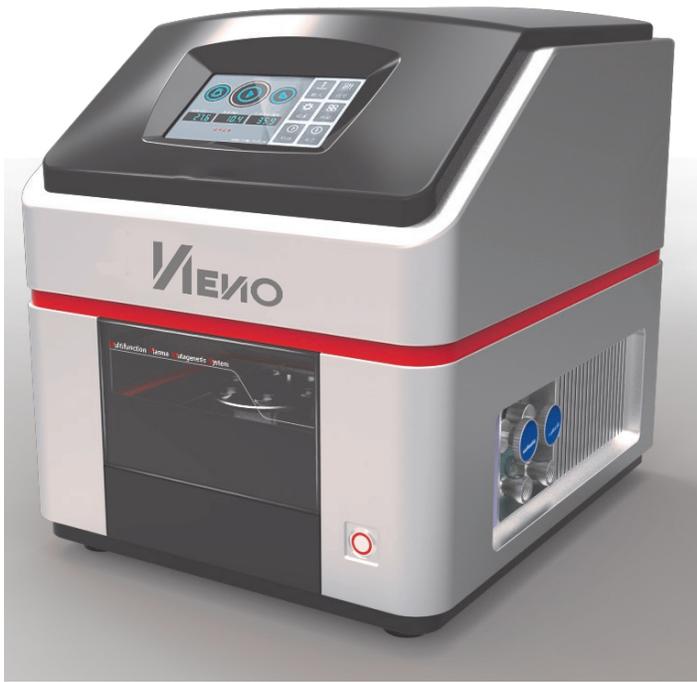
2. 等离子体穿透细胞壁（膜），引起基因损伤，激活细胞修复机制，产生新的碱基序列



3. 筛选和驯化，得到目标菌株



4. 应用于生产，提高经济效益



多种诱变机制，突变种类丰富

集成等离子体、紫外和化学诱变，既可进行单因子诱变，也可以进行复合诱变，突变类型丰富。

独有的等离子体发生技术，致死率稳定

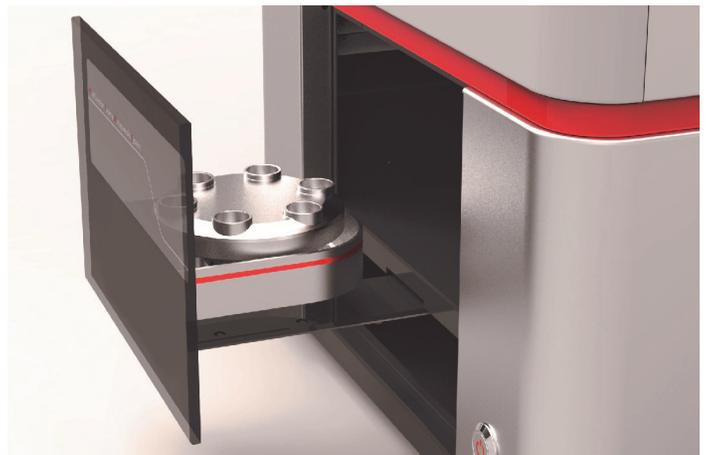
拥有专利的等离子体发生器，能够持续有效地产生均匀稳定的常温等离子体，诱变致死率更稳定。

消耗氮气，运行成本低

以氮气作为工作气体，运行成本低。

两种样品制备方式，照射均匀

既可以用诱变杯对菌种液膜进行诱变，也可以直接在平皿上进行诱变。精密的自动化控制技术使得平皿能够被等离子体流均匀照射。



全自动软件，操作轻松

7英寸触摸屏，软件界面简单直观，只需要轻松的几步点击即可完成诱变方式、诱变模式和诱变程序的设置和操作。

克雷伯氏菌 (*Klebsiella pneumoniae*) 中1,3-丙二醇高产菌株的等离子体诱变和选育

1,3-丙二醇 (1,3-DP) 为重要的化工原料, 其生产方法之一为经克雷伯氏菌 (*Klebsiella pneumoniae*) 发酵甘油。野生克雷伯氏菌1,3-DP产量较低, 对甘油浓度的耐受性较差。

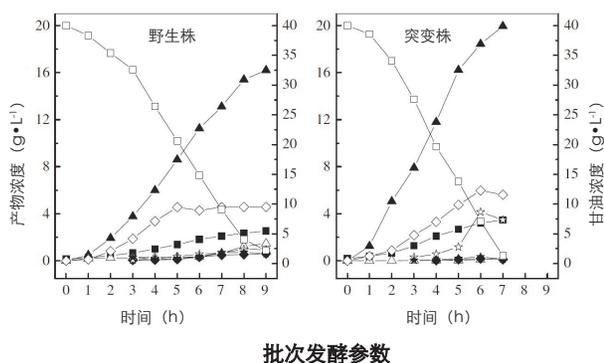
对野生克雷伯氏菌进行等离子体诱变处理后, 经过筛选, 得到了一个高产突变株。

检测该高产率突变株发酵液中与产物合成相关的3种酶 (GDH, GDHt和PDOR), 发现其活性都有较大比例的提高:

酶活性检测

比活	实验结果	
	野生株	突变株
GDH活性 ($U \cdot mg^{-1}$)	0.11 ± 0.03	0.67 ± 0.007
GDHt活性 ($U \cdot mg^{-1}$)	9.2 ± 0.5	14.4 ± 0.8
PDOR活性 ($U \cdot mg^{-1}$)	0.15 ± 0.03	1.6 ± 0.1

突变株的生长速率、甘油消耗速率和1,3-丙二醇合成速率均高于野生株:



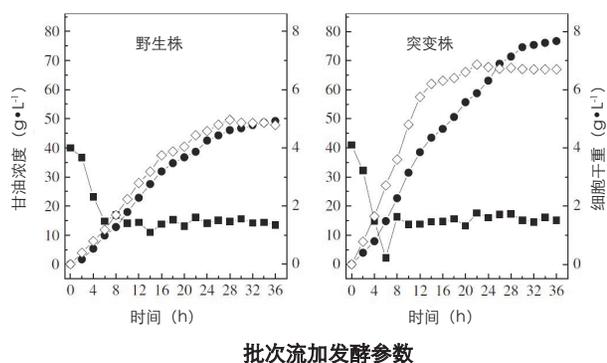
实心方块: 细胞干重, 空心方块: 甘油, 实心三角: 1,3-丙二醇, 空心三角: 乙醇, 空心菱形: 乙酸, 实心菱形: 2,3-丁二醇, 空心星形: 琥珀酸, 实心星形: 乳酸

批次发酵数据显示, 相比野生株, 该突变株的1,3-丙二醇最终浓度增加了23%, 乙酸的最终浓度增加了22%。实验证明, 乙酸产量的增加有利于1,3-丙二醇的产量:

批次发酵参数

发酵参数	实验结果	
	野生株	突变株
甘油消耗量 ($g \cdot L^{-1}$)	37.9	38.7
细胞干重 ($g \cdot L^{-1}$)	2.6	3.5
乙醇浓度 ($g \cdot L^{-1}$)	1.5	0.25
乙酸浓度 ($g \cdot L^{-1}$)	4.6	5.6
乳酸浓度 ($g \cdot L^{-1}$)	0.62	0.15
2,3-丁二醇浓度 ($g \cdot L^{-1}$)	0.59	0.11
琥珀酸浓度 ($g \cdot L^{-1}$)	0.92	0.59
1,3-丙二醇摩尔产率 ($mol \cdot mol^{-1}$)	0.51	0.62
1,3-丙二醇生产强度 ($g \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$)	0.70	0.82
甘油相对消耗率 ($g \cdot g^{-1} \cdot h^{-1}$)	1.6	1.6

在微氧条件下进行批次流加发酵, 发现突变株提前16 h进入平台区:



实心方块: 甘油, 实心三角: 1,3-丙二醇, 空心菱形: 细胞干重

在批次流发酵中, 相对于野生型, 突变株的产物浓度提高了56%, 产率提高了35%, 生产强度提高了55%, 相对发酵速率提高了10%。

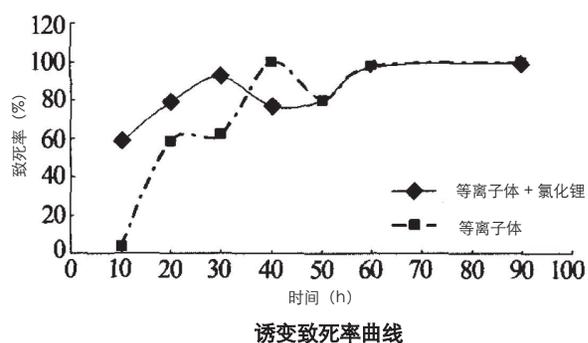
针对克雷伯氏菌的其他研究也显示, 等离子体诱变处理能获得优良的高产变异株。

壳青霉 (*Penicillium crustosum*) 高抑菌活性菌株的等离子体诱变和选育

海洋微生物是十分重要的物种资源库，在药物开发上具有巨大的前景。挖掘现有菌种资源的药用价值，开发新的耐极端环境的菌种资源，是提高海洋微生物利用价值的有效方式。

对壳青霉菌株AP2T1的单孢子悬浮液进行等离子体诱变处理和等离子体+化学诱变剂处理，并对诱变处理后的存活菌落进行拮抗DDRT(-)指示菌的活性筛选，经初筛后得到了一个抑菌活性增强的正向突变株D-5-D-23。

对诱变处理后的孢子进行培养，以未经诱变处理的菌落作为对照，计算致死率，得到致死曲线：



随诱变时间的增加，致死率增加，但到达一定致死率出现降低。该现象表明该真菌孢子细胞内的修复机制被激活了。在非常高的诱变剂量下，致死率出现饱和。

以DNA修复损伤基因缺陷的大肠埃希氏菌，即DDRT(-)作为指示菌，采用平板琼脂块扩散法对等离子体处理后的菌株进行初筛，检测抑菌圈直径和菌落琼脂块直径之比：

拮抗DDRT(-)活性初筛结果

菌株	初筛抑菌圈直径 (mm)	抑菌圈/菌块直径比
D-5-D-23	9	3
其他突变株	≤4	≤1.3
初筛对照	5	1.7

采用摇瓶培养-滤纸片法进行复筛，检测提取物的抑菌圈直径和纸片直径之比：

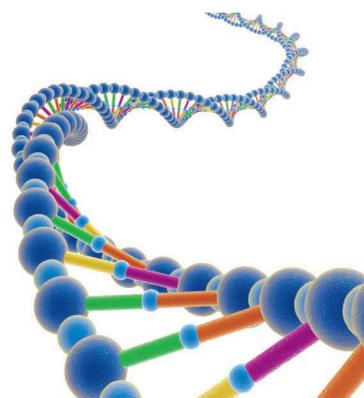
拮抗DDRT(-)活性复筛结果

菌株	复筛抑菌圈直径 (mm)	抑菌圈/纸片直径比
D-5-D-23	9	1.8
其他突变株	-	-
复筛对照	7	1.4

活性筛选结果显示，该正向突变株的抑菌圈直径与菌块直径之比可达3。作为对照的初始菌株的圈/块直径比为1.7，这可能是由于其产孢培养时间过长而导致原菌种衰退。

采用等离子体+化学诱变组合，可观察到与单独等离子体诱变有差别的致死率曲线，这表明这两种诱变方式在机制上可能不同。

研究结果显示，等离子体照射能够激活衰退菌株的代谢能力，增强其生物活性。



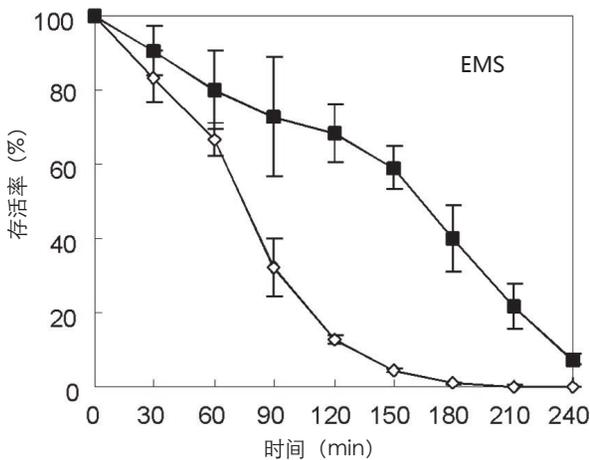
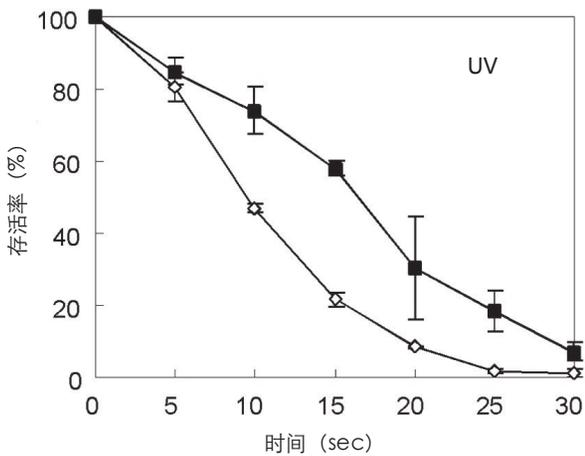
工业酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 二倍体营养缺陷株的紫外诱变和分离

酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)的营养缺陷株广泛用于经典遗传学研究、分子生物学和基因工程。

工业酿酒酵母菌株通常为二倍体或多倍体，且无营养缺陷变异。由于存在两套基因，从工业菌株中分离二倍体隐性突变株较为困难。因此，营养缺陷株一般分离自单倍体的实验室菌株。

利用紫外和EMS对清酒酵母 (sake yeast) 菌

株进行处理，获得存活率曲线：



紫外和EMS处理的存活率曲线

实心方块：二倍体，空心菱形：单倍体

采用紫外诱变，二倍体和单倍体的存活率曲线比较接近。故选择紫外照射20秒作为诱变条件。

采用影印培养法，从经过诱变处理的菌落中挑选出相应的营养缺陷株。

营养缺陷变异

菌株	存活率	突变率
Kyokai no. 7	22%	5.8×10^{-4}
Kyokai no. 9	19.3%	5.9×10^{-4}
Kyokai no. 10	13.4%	6.6×10^{-4}
Kyokai no. 701	9.9%	1.4×10^{-3}
Kyokai no. 901	8.1%	2.0×10^{-3}
RAK1536	17.8%	5.3×10^{-4}

经过诱变和筛选，分离得到His⁻, Met⁻, Lys⁻, Trp⁻, Leu⁻, Arg⁻和Ura⁻等缺陷突变株。

对Kyokai no.7的His⁻突变株RAK1536进行二次诱变处理，得到具有His⁻Lys⁻双重突变的菌株。

再经过互补基因克隆、质粒构建和菌株构建等过程，获得可供商业使用的营养缺陷菌株系统。

从上表可以看出，紫外诱变的突变率大于根据单倍体基因突变率得到的计算值 (1.0×10^{-6})。

研究表明，采用紫外诱变，用于单倍体实验菌株的分离方法也适用于二倍体分离。

利用营养缺陷标记的菌株系统进行基因操纵，可获得药物抗性标记没有的一些优势，如较高的转化效率。

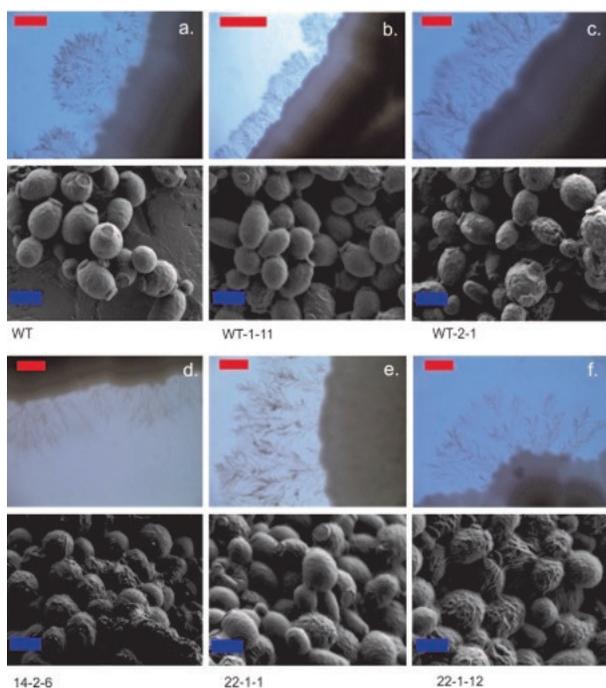
在质粒构建过程中采用自体克隆，还可避免公众对基因修饰微生物的担心。

树干毕赤酵母 (*Scheffersomyces stipitis*) 厌氧和高乙醇产率突变株的紫外诱变和选育

植物细胞壁木质纤维素是十分丰富的可再生碳源，其主要成分为葡萄糖、木糖、阿拉伯糖和半乳糖（含量依次减少）。目前，工业上用酿酒酵母从谷类淀粉发酵生产乙醇。酿酒酵母菌株可发酵己糖（葡萄糖和半乳糖），但不能发酵戊糖（木糖和阿拉伯糖）。为满足可再生能源的发展，需要寻找能发酵纤维素生产乙醇的新方法。

野生毕赤酵母在微氧条件下即能发酵己糖和六糖，但其糖消耗较酿酒酵母小。对起始菌株Y-7124进行紫外线照射1分钟，筛选出2个耐无氧条件的菌株。再次进行较长时间的照射，得到了5个耐厌氧条件的突变株。

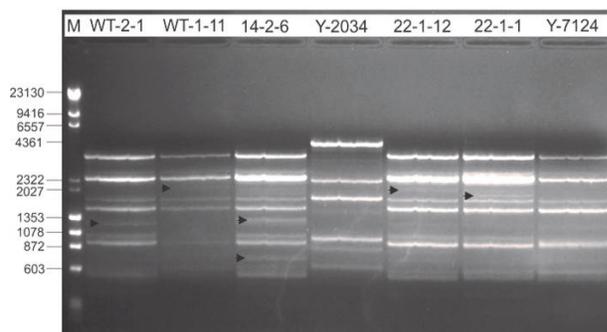
经扫描电镜检查，这5个突变菌株具有与野生型不同的形态，即细胞大小和表面形状均有差异：



野生型(WT)和5个突变株的电镜图片

上图：高清晰度细胞表面，下图：细胞表面

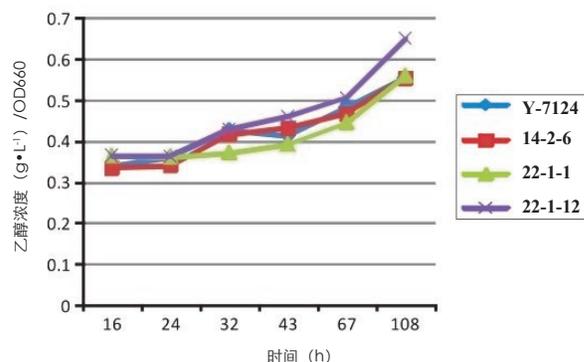
经VNTR指纹图谱分析，发现这些突变株出现了野生型没有的条带：



野生型、酿酒酵母和5个突变株的VNTR指纹图谱

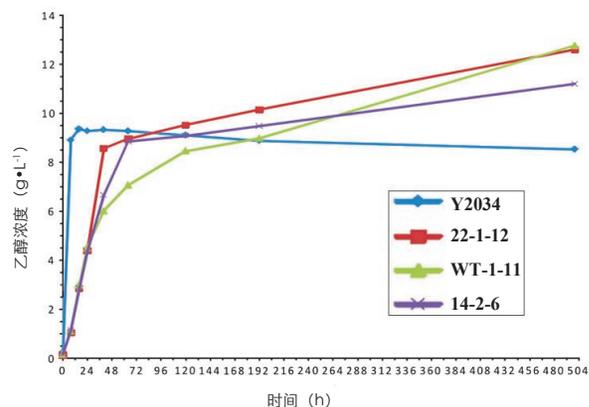
左侧为碱基对标的物 (M)，箭头指示在野生型中没有的序列

在微氧条件下，以木糖和葡萄糖进行发酵，5个突变株和野生型具有基本上相同的总糖消耗量，其乙醇产量也相当。按细胞重量进行归一化，发现其中一个突变株具有更高的乙醇浓度：



微氧条件下突变株和野生型的发酵结果

在严格无氧的条件下，以木糖和葡萄糖进行发酵，酿酒酵母Y2034在12个小时后消耗完葡萄糖，乙醇产量不再增加。突变株在80至120小时后达到酿酒酵母的最大产量，且一直保持增长。



严格厌氧条件下突变株和酿酒酵母的发酵结果

研究显示，利用紫外线进行诱变，可获得耐厌氧条件且乙醇产率较好的毕赤酵母突变株。

技术参数

型号	NENO
工作气体	99.999%及以上氮气
气体流量	0 至 20 slpm
工作环境	温度： -10 至 40 °C 湿度： ≤70%
防护等级	IP53
整机尺寸	510×420×480 mm
净重	35 kg
电源需求	220 VAC, 50 HZ
整机功率	300 W

莱诺（烟台）分析仪器有限公司

山东省烟台市莱山区金海创业大厦C217室

Tel: 13285456036

邮箱：yt_lai nuo@163.com

