

## 通过筛选抑菌圈发现新型抗生素

为了满足针对耐药性微生物治疗不断增长的需求，开发出了基于竞争的自适应进化筛选方法。这种方法存在的一个难题就是如何从一个多样性的微生物克隆库中找到高价值的菌株，筛选到适合下游药物开发，能够产生新型抗生素的最好候选菌株。

对于从克隆库中筛选抗生素产生菌株来说，通常使用琼脂平板抑菌圈或透明圈筛选法。具有抗性的克隆可以产生并分泌对平板微生物具有抑制作用的代谢产物，因此在克隆周围产生了透明圈，根据透明圈的大小可以准确地从克隆库中筛选出这些菌株。透明圈的直径和抗性代谢产物产量一般成正比比例关系。因此，高价值的菌株通常产生直径最大的透明圈。这些克隆被筛选出来用于进一步的特性研究和药物开发。

如果使用人工筛选并挑取产生抑菌圈的克隆，整个过程不但慢、烦琐，而且易出错。为了解决这些问题，Molecular Devices开发出了QPix400系列微生物克隆筛选系统，提供了高通量自动化克隆筛选和挑取平台，具有无与伦比的性能和效率。这里我们详细描述了如何使用这个系统以及软件模块客观筛选并挑取高价值的透明圈产生菌株。

### 产生抑菌圈克隆的识别

*Streptomyces clavuligerus*可以产生超过20种具有生物活性的次级代谢产物。包括许多β-内酰胺类抗生素，如cephamycin C、cephalosporin C、clavulanic acid等。这里使用*Streptomyces clavuligerus*(ATCC 27064)作为模式生物，演示针对*E.coli* (Migula, Castellani and Chalmers ATCC 47076)的抑菌圈的识别和挑取。两个菌株都从ATCC获得，使用TSB培养基进行培养。液体培养阶段使用摇床培养1-3天，相应的*S. clavuligerus*在30℃，*E.coli*在37℃培养。*S. clavuligerus*经过培养后，稀释培养液OD600值在0.10-0.13之间，取2ul培养液点到TSA琼脂板上，28℃培养3-5天。*S. clavuligerus*在TSA平板生长后，经过稀释的*E.coli*培养液被均匀地涂布到平板上，确保*E.coli*完全环绕并接触到每个*S. clavuligerus*克隆。平板28℃继续培养1-2天，并每天观察。如图1所示，*S. clavuligerus*克隆产生针对*E.coli*的抑菌圈。

### 优势

- 适用于各种适应性进化方面的应用
- 加快新型耐药菌株感染治疗方法的开发速度
- 用户自定义软件参数，发现独特的生物学特性
- 通过可靠的自动化解决方案筛选高价值克隆

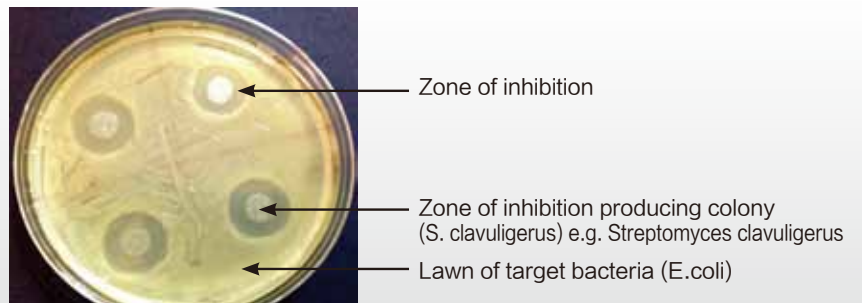


Figure 1. 产生抗性产物的*S. clavuligerus*克隆周围*E.coli*生长被抑制。这可以通过*S. clavuligerus*克隆周围的透明圈识别。

使用QPix400系统的抑菌圈识别软件模块对平板进行白光成像，如图2所示，软件识别具有透明圈的克隆。高级的软件算法允许用户自定义筛选参数，筛选并挑取符合特定要求的抑菌圈，如克隆大小、抑菌圈直径、克隆直径、轴比以及克隆边缘形状等（图2）。

接下来，软件选择的可以产生抑菌圈的克隆以缩略图的形式排列。克隆可以以多种顺序进行排列，比如总的透明区域大小、克隆大小、轴比、边缘形状等（图3）。软件自动列出了每个产生抑菌圈克隆的详细定量数据，方便随时查看。

### 基于克隆库筛选并挑取产生抑菌圈的克隆

为了进一步验证基于克隆库或者自适应进化的自动抑菌圈识别和筛选方法的效果，筛选了点有多样微生物克隆库的QTrays培养板。

专用的软件模块从QTray上长出的48个克隆中准确筛选出了3个产生抑菌圈的克隆（如图4）。这种方法可以实现高通量有目的地从一个大的微生物克隆库中筛选、识别和挑取产生透明圈的克隆。

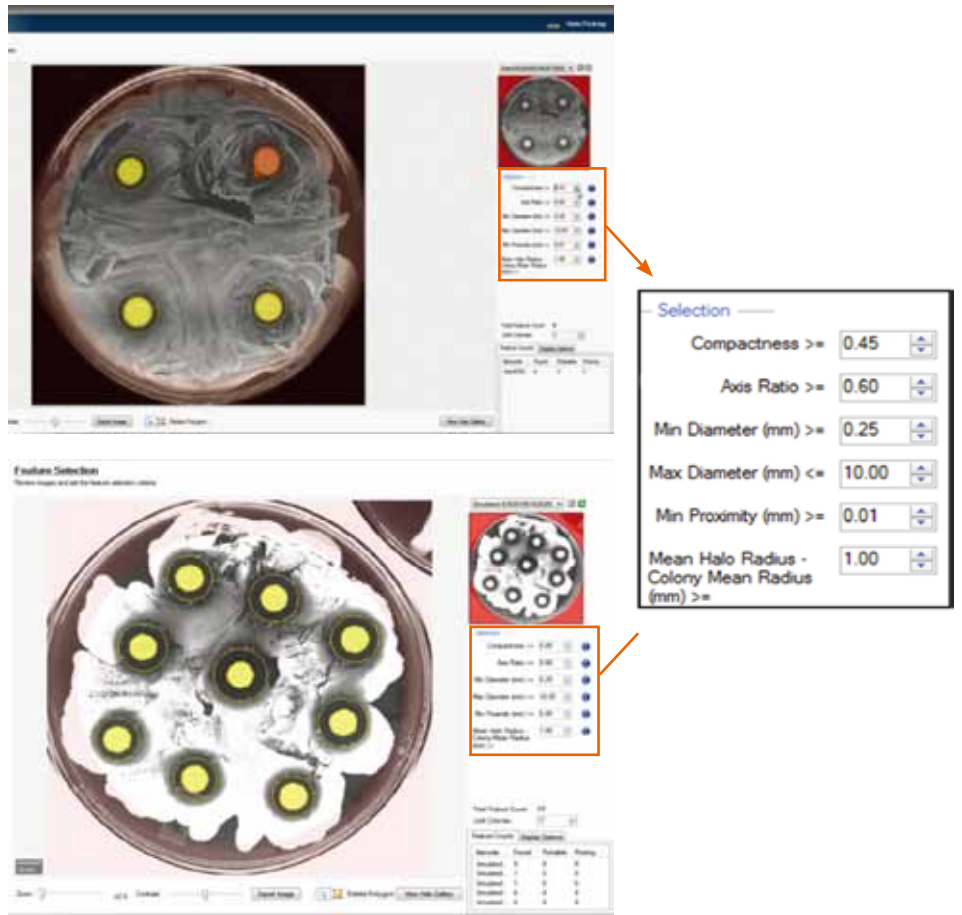


Figure2. QPix软件2.0或者更高版本的抑菌圈识别模块可以准确识别每个克隆以及相应的透明圈的大小。根据用户自定义的筛选参数，软件自动选择产生透明圈的克隆。

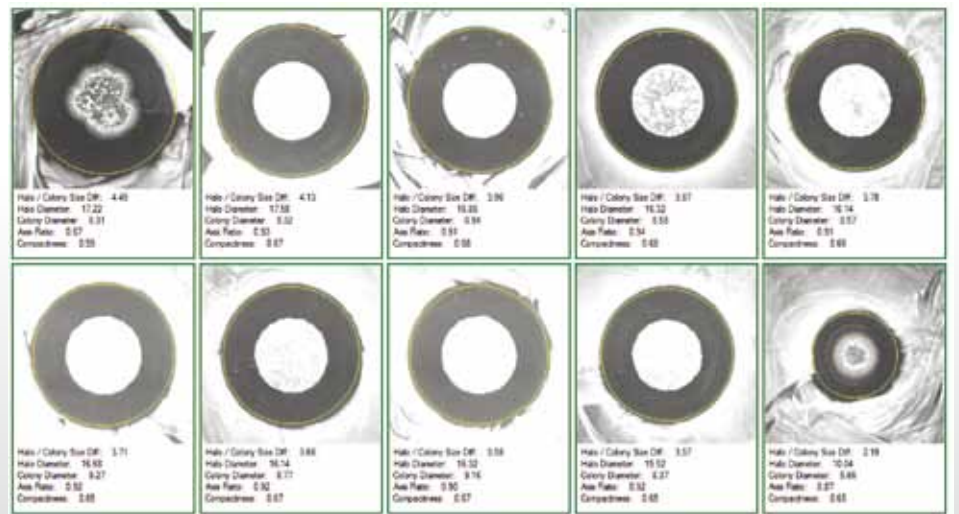


Figure3. 根据用户自定义的排列顺序，每个克隆和透明圈的数据以缩略图的形式按顺序排列。

## 总结

市场需要不断开发出新型抗生素用于治疗耐药菌感染引起的疾病。为了开发新型抗生素或者微调抗生素的生物合成途径，国内外科研人员付出了许多的努力。基于克隆库筛选或者基于竞争性自适应进化都可以用于产生广谱抗生素过量产生菌株。

使用QPix400系列微生物克隆筛选系统以及QPix抑菌圈软件识别模块，我们可以轻松并且可靠地进行高通量筛选透明圈产生克隆。这个自动化的筛选方法将大大增加我们寻找新型抗生素的能力，用于应对已有的或者新出现的抗生素耐药菌引起的疾病。

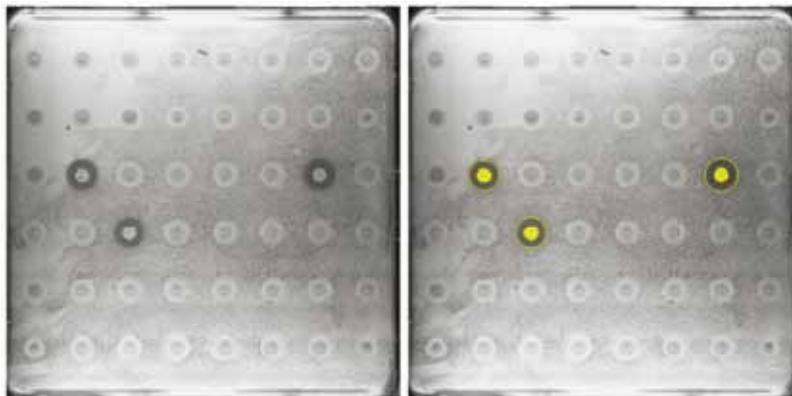


Figure4.基于克隆库高通量抑菌圈产生克隆的筛选，发现新的抗生素。QPix软件2.0或更高版本的抑菌圈识别模块可以准确识别并选取产生透明圈的克隆。软件用黄色标记出被选取的克隆。