

冷冻真空干燥保存法

冷冻真空干燥保存法（简称“冻干法”），是目前长期保存细菌、酵母菌、真菌、病毒和立克次体的标准方法，同样适用于部分难以保存的病原菌，如脑膜炎奈瑟菌、淋病奈瑟菌等。其原理是将加入保护剂的菌（毒）种快速冻结成固态，在低温减压下利用升华现象除去水分而干燥，经真空冷冻干燥后的菌（毒）种细胞结构、成分保持原来状态，代谢活动趋于静止，从而达到半休眠的状态。冻干过程可分为预冻、升华干燥和解析干燥三个阶段。经过冻干的菌种可保存 10 ~ 20 年，并保持较高的存活率和稳定的遗传性状。冷冻干燥法是目前应用最广泛、效果最好的一种菌种保存方法。

冻干法的操作流程是将理想条件下生长的微生物细胞以相当高的浓度（ $10^6 \sim 10^7/\text{ml}$ ）分装在小灭菌瓶或安瓿内，迅速将这些小瓶在极低温度的液体溶剂内水浴或用仪器超低温冷冻（ -60°C ），再用真空泵除去这些冷冻悬浮液中的水分，在真空状态下用空气喷灯熔解小瓶顶部的玻璃进行热封口，然后贮存于低于 5°C 的冰箱内。保存温度低（ $-70 \sim -30^\circ\text{C}$ ）可以延长其活力。当微生物浓度较高时，存活率高，保存期也长。长期保存时，贮藏温度越低则越好。

在冻干前通常需要加入冷冻保护剂，其作用是避免细胞在冷冻初期因为形成冰晶而造成损害。常用的保护剂有 10% 脱脂牛奶、12% 蔗糖，有报道显示牛或马的血清、甘油和二甲亚砜（dimethylsulfoxide, DMSO）也可防止冷冻中微生物的死亡，实际操作中应根据菌（毒）种的不同而选择不同的保护剂。

材料

原料为待保存的纯菌（毒）种、2% 的盐酸、冷冻保护剂（通常为 10% 的脱脂牛奶）。设备为冷冻真空装置（冻干仪）、安瓿管或冷冻管、离心机、脱脂棉、铝制封口盖等。

操作步骤

1. 冷冻干燥管的选择与清洗 冷冻干燥管一般采用耐温度骤变、耐压、管壁厚度均一并且为中性玻璃的安瓿管。管的内径为 8 mm 左右，长度不小于 100 mm。

清洗安瓿管时，先用 2% 的盐酸浸泡过夜，然后用自来水冲洗 3 次以上，最后用蒸馏水冲洗、浸泡至 pH 中性，然后干燥。

2. 标签的准备 菌（毒）种的标记方法有很多种，一般分为管外侧标记和管内标记两种。

管外侧标记常用以下两种方式。

（1）采用标签机在大小为 1 cm×3 cm 左右的标签上打印菌种编号、保藏日期，然后贴在安瓿管外。

（2）将胶布剪成大约 1 cm，宽 3 ~ 4 cm 长的小条，在上面填写菌种编号，保藏日期，然后贴在安瓿管外。

管内标记法：选择滤纸或吸水纸（大小为 1 cm×3 cm）记录菌种的编号、保藏日期、灭菌后装入冷冻干燥后的安瓿管内。

3. 保护剂的选择和准备 保护剂可以减少冷冻干燥引起的微生物细胞损伤。保护剂的选择与配制因保藏的菌种的不同而有变化。配制保护剂时，应注意保护剂为脱脂乳。厌氧微生物冷冻干燥所用的保护剂在使用前应在 100℃ 的沸水中煮沸 15 min 左右，脱气的保护剂放入冷水中急冷，以除掉保护剂中的溶解氧。

常用保护剂类型及种类如下。

（1）酸性化合物，如谷氨酸、天门冬氨酸、苹果酸。

（2）中性化合物，如葡萄糖、乳糖、蔗糖、棉子糖、山梨醇、木糖醇、肌醇等。

（3）高分子物质及其分解物，如白蛋白、明胶、蛋白胨、藻类等。

（4）天然混合物，如脱脂乳、血清等。

（5）其他，如抗坏血酸、羟胺等。

4. 菌（毒）种的准备 在所保藏菌（毒）种的最适培养条件下将细胞培养至冷冻干燥所需菌龄，一般病毒须培养至对数生长期；细菌和酵母菌的菌龄要求超过对数生长期，以 24 ~ 48 h 为宜；酵母需培养 3 天；形成孢子的微生物则宜保存孢子；放线菌与丝状真菌则培养 7 ~ 10 天。

（1）用斜面培养物制备菌液：取 1 ~ 2 ml 保护剂，加到试管斜面培养物上，用较长的滴管慢慢摩擦斜面，制备均匀的细胞悬液，注意泡沫不宜过多，并且不要刺挖琼脂；然后尽快将细胞悬液分装到安瓿管中。

（2）用液体培养物制备菌液：离心收集液体培养物中的菌体，弃去上清液，加入保护剂（每毫升培养物加 12 ml）。将培养物与保护剂混匀，分至安瓿管。

5. 分装与加棉塞 分装菌液应在无菌条件下操作。采用较长的滴管，直接将菌液（病毒液）滴入安瓿管或冻存管底部，注意不要溅污上部管壁，每管分装量为

0.1~ 0.2 ml。一般 2 ~ 2.5 ml 菌液可以分装 10 ~ 15 个安瓿管。若为球形安瓿管，装量为半个球部。分装后用脱脂棉堵住安瓿管管口，注意不要过紧或过松。分装时间尽量要短，最好在 1 ~ 2 h 内分装完毕并预冻。

6. 预冻 不同保护剂的共晶点温度不同，预冻温度应低于共晶点温度 10℃ 左右。

目前，常用降温方法有以下三种。

(1) 程序控温降温法：应用程序控温降温仪，可以稳定连续降温，能很好地控制降温速率。

(2) 冷冻干燥机自行冷冻：某些冷冻干燥机具有冷冻功能，在真空泵不开启的情况下，可将菌（毒）种冷冻到 -40℃ 左右。

(3) 将菌（毒）种放入 -80℃ 冰箱预冻：预冻速度控制在每分钟下降 1℃，使样品冻结到 -35 ~ -40℃。

7. 冷冻干燥 采用冷冻干燥机进行冷冻干燥。

将预冻后的样品安瓿管迅速置于已充分预冷的冷冻干燥机样品仓内，关闭放气阀，打开真空泵开始预冻干燥，接近干燥完成时，适当升温（按冷冻干燥机的具体要求进行操作）。确认冷冻干燥完毕后，缓慢打开放气阀，取出样品安瓿管置于干燥器内，备用。

判断冷冻干燥已完成的指标为：①安瓿管内冻干物呈酥松块状或松散片状；②冷冻干燥机显示的样品温度与舱内温度接近；③蒸馏水对照管中的水分已完全挥发掉；④ 1% ~ 2% 氯化钴的对照管已呈深蓝色。

8. 安瓿管封口及真空检验 从干燥器中取出冷冻干燥完全的安瓿管，距管口 5 cm 左右用喷射火焰（喷灯、焊枪等）将安瓿管拉细，然后将安瓿管口连接到与真空安瓿管泵相连的橡皮管上，打开真空泵。在真空条件下（一般真空度达到 0.001 Tom），用喷射火焰对准安瓿管细颈部加热熔封。熔封后的干燥管可采用高频电火花真空测定仪检测真空度。

9. 保藏封口完全的冷冻干燥管应低温避光保藏。

10. 质量检查一般在封口后 1 天、7 天、30 天随机抽取若干支冷冻干燥管进行各项指标检查，例如存活率，以及反映生产能力、形态变异、杂菌污染等情况的指标等。

11. 冷冻干燥菌（毒）种的复苏方法先用70% 酒精棉擦拭安瓿管上部，将安瓿管顶部烧热，用无菌棉签蘸取灭菌水，在顶部擦一圈。顶部出现裂纹后，用锉刀或镊子颈部轻叩一下，敲开已开裂的安瓿管的顶端，用灭菌水或培养液溶解菌（毒）块，使用无菌吸管移入新鲜培养基，进行培养。