

微生物菌种保藏技术发展 with 菌种库建设

周宇光

2024-02-27



中国科学院微生物研究所
Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences



1、微生物菌种保藏技术

技术要点：处于低温、隔氧、干燥、避光等环境中，使微生物尽量降低或停止代谢活动，减慢或停止生长繁殖

基本要求：在较长时间内保持生命活力和相对遗传稳定性；不污染杂菌

<i>E.coli</i> 在不同温度下的代时	温度 (°C)	代时 (分)	温度 (°C)	代时 (分)
	10	860	35	22
	15	120	37	17
	20	90	40	17.5
	25	40	45	20
	30	29	47.5	77

主要的菌种保存技术方法

- 1. 继（传）代法：**常温、低温；斜面、穿刺；覆盖液体（蒸馏水、矿油）
- 2. 干燥法：**冷冻干燥法、L-干燥法；载体吸附干燥法（土壤、砂粒、硅胶、玻璃珠、滤纸片、明胶片、曲料、麦粒等）
- 3. 冻结法：**-20°C冰箱、-80°C冰箱、-150°C冰箱；液氮冰箱（气相）

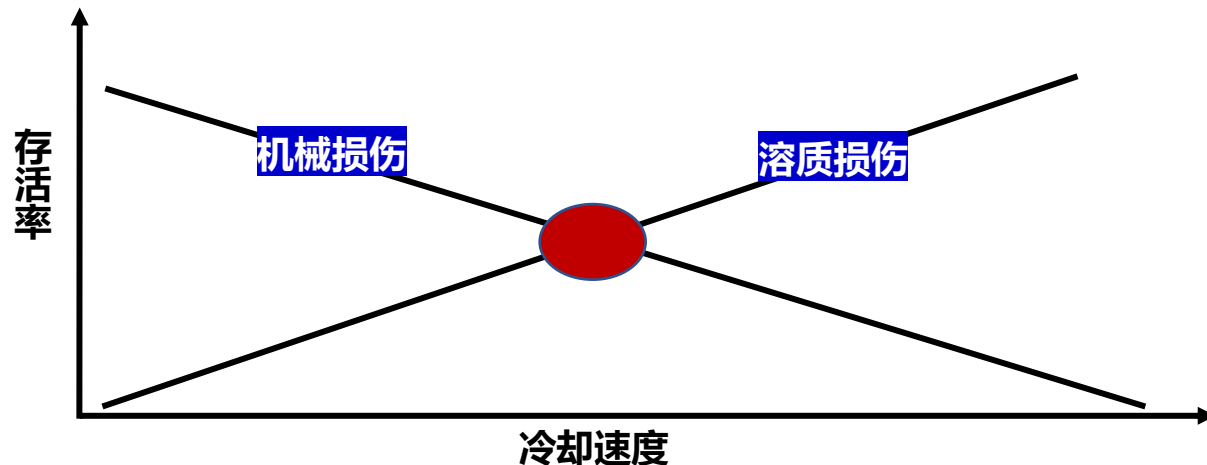


保存制备过程中的细胞损伤

- 干燥和冻结过程对细胞的损伤客观存在、不可避免
- 生理损伤和致死损伤。二者之间的关系复杂，很难截然区分
- 造成的生理损伤是暂时的，通过提供**极佳的恢复生长条件**，多数生理损伤可在短期内恢复
- 有时，细胞的生理损伤会在生理、代谢、遗传等方面对生物体造成不利影响，致使发生突变
- 加入保护剂，优化制备条件，完善制备程序、减少致死损伤。

冷冻导致细胞损伤的机理

- ❑ **机械损伤**：细胞内外冰晶生长而产生的机械力量对膜结构造成的损伤，从而影响细胞正常的生理、代谢功能。
- ❑ **溶质损伤**：水的冻结使细胞间隙液体逐渐浓缩，胞内电解质浓度、pH值和离子强度改变，不利化学反应提高；细胞膜脱水收缩达到临界时，细胞膜渗透率产生不可逆改变等。
- ❑ **细胞的损伤是全方位的**：膜系统的完整性受损（膜的融合和膜的相变）；或亚细胞结构受破坏；或代谢酶失活等



适宜的冷却速率取决于细胞表面积与体积之比，以及膜的渗透率；不同类型的细胞，其最适冷却速率相差极大，从 $10^3^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 到每分钟几度或更低

干燥对微生物细胞的损伤

- 缺水引发的生理损伤，尤其对于不耐干燥的微生物。
- 很大程度是由于干燥引起膜脂的性质、结构、功能的改变，膜的流动性或完整性改变，导致膜的功能失调，造成细胞死亡。
- 干燥菌种的储存效果（稳定性和储存期限），在很大程度上取决于样品中的含水量（通常应控制在1.5-3%，过高的水分残存量，危害更大）

冻干菌种的复苏培养

- ❑ 冻干菌种的复苏培养比正常菌种所要求的培养条件更严格，且有差别
- ❑ 冻干菌种恢复培养时，需要复水过程。复水的液体和培养温度直接影响存活率
- ❑ 一般而言，采用液体的最适培养基复水，移植于最适培养基和最适温度，可以得到较好的培养结果

小结一

- ❖ **由于微生物的多样性，不同种类的微生物往往对不同的保藏方法有不同的适应性**
- ❖ **选择适宜的培养基、培养温度和菌龄，以便得到健壮的细胞或孢子**
- ❖ **应采用至少两种不同的技术方法进行保藏；如果只能用一种保藏方法，应在不同的设施设备中建立备份**
- ❖ **对于菌种的长期保藏，应优先采用低于-140 °C的冻结方法，-80°C冻结只是一种可以接受的方法。**

低温冻结保护剂

- **渗透型保护剂**：使胞内压接近胞外压，降低细胞脱水皱缩的程度和速度；易进出细胞，复温时缓解渗透性肿胀引起的损伤。（甘油、DMSO、乙二醇、乙酰胺、丙二醇等）
- **非渗透型保护剂**：使溶液呈过冷态，可在特定温度下降低溶质浓度；使胞内水分提前部分渗出，缓解胞内冰晶的形成。（聚乙烯吡咯烷酮、蔗糖、葡聚糖、白蛋白等）

。

干燥保护剂

1. 脱脂奶粉10 ~ 20g, 蒸馏水100ml
2. 谷氨酸钠1g, 脱脂奶粉10g, 蒸馏水100ml
3. 蔗糖12g, 繁殖用培养基100ml
4. 乳糖 6g, 脱脂奶粉12g, 蒸馏水100ml
5. 葡萄糖 7g, 乳糖 7g, 蒸馏水100ml
6. L-谷氨酸钠3 g, 核糖醇1.5 g, L-半胱氨酸盐酸盐0.05 g, 0.1M 磷酸钾缓冲液(pH7.0)100ml
7. L-谷氨酸钠5 g, 核糖醇1.5 g, 山梨醇1g, 75%海水100ml, pH7.0

复水液

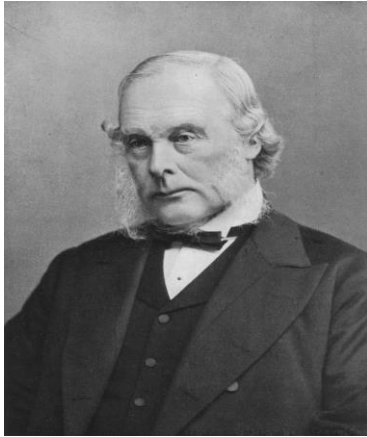
1. 细菌：蛋白胨 10.0g, 酵母提取物 2.0g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.0g, 蒸馏水1.0L, pH7.0
2. 酵母菌：葡萄糖 10.0g, 蛋白胨 5.0g, 酵母提取物 3.0g, 麦芽提取物 3.0g, 蒸馏水 1.0L; pH6.0
3. 真菌（放线菌）：蛋白胨 5.0g, 酵母提取物 3.0g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.0g, 蒸馏水 1.0 L, pH7.0

推荐的长期保藏方法

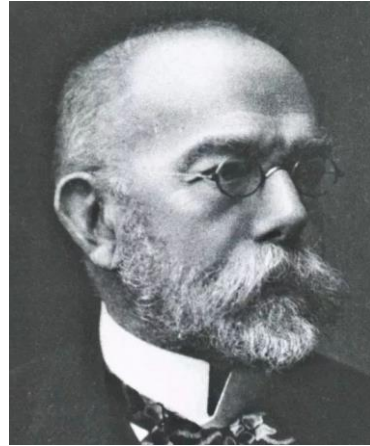
生物材料	方法一（低温保藏）	方法二（干燥保藏）
细菌	优选低于-140°C (-80°C可以接受)	L-干燥、冷冻干燥
真菌	优选低于-140°C (-80°C可以接受)	L-干燥、冷冻干燥
	不产孢真菌补充矿油 or 蒸馏水斜面	
古菌	优选低于-140°C (-80°C可以接受)	L-干燥、冷冻干燥
蓝细菌	低于-140°C	L-干燥、冷冻干燥
	如果不可以长期保藏，连续传代	
微藻	低于-140°C	连续传代（液体 or 半固体）
病毒	低于-140°C	冷冻干燥
噬菌体	低于-140°C	L-干燥（滤纸）
质粒/DNA文库	低于-70°C or 低于-140°C（混合宿主）	冷冻干燥（混合宿主）

2、菌种库建设

第一个菌种保藏中心



1878, Joseph Lister
建立稀释技术



1881, Robert Koch
建立固体培养基划线分离方法



1890, Prof. Frantisek Kral在
布拉格German大学建立了世界
上第一个菌种保藏中心。
1900, 第一本菌种目录



确立了菌种保藏中心的基本功能：收集、保藏、提供

深刻影响菌种保藏的三个技术

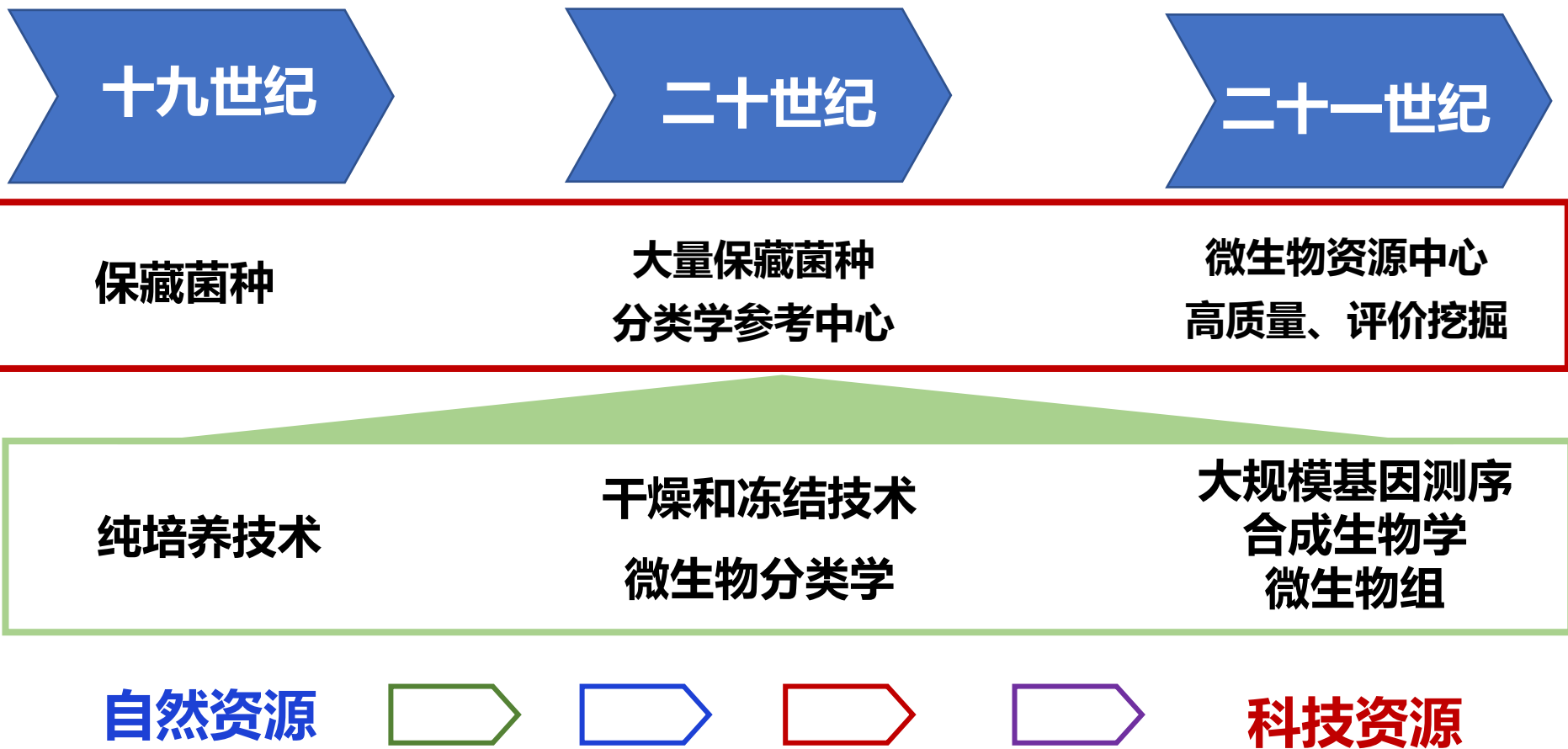
1. 纯培养技术
2. 超低温冻结技术
3. 基因测序技术

基因（组）测序技术的应用和常规化，对微生物菌种保藏工作带来深刻影响

- 真正具备了对保藏菌种全面开展复核鉴定的技术能力
- 菌种资源获取能力也得到极大提升
- 一定程度上具备了开展菌种资源应用潜力评价的通用技术方法



保藏中心的演化



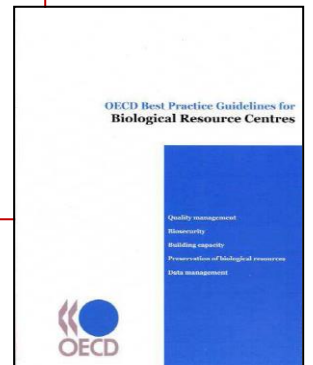
其它一些挑战

- **生物多样性公约 (CBD) (1993)**
- **与贸易有关的知识产权协定 (TRIPS) (1995)**
- **获取遗传资源以及公正和公平地分享其利用所产生惠益的名古屋议定书 (ABS) (2014)**
- **国家管辖范围以外区域海洋生物多样性的养护和可持续利用协定 (BBNJ) (2023)**
- **生物安全相关国际、国家法规**

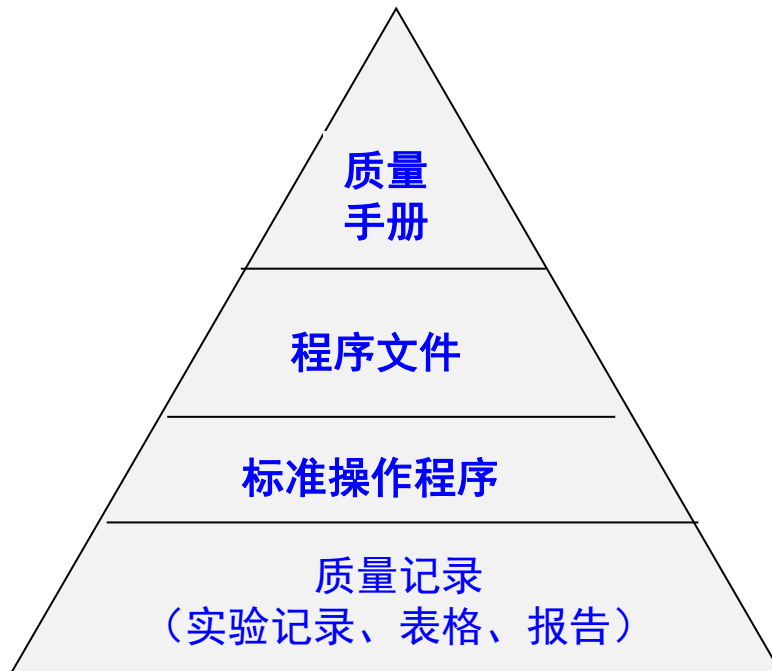
建设内容

1. 保藏能力
2. 质控能力
3. 资源发现与挖掘能力
4. 生物安全管控能力
5. 数据信息管理能力
6. 人员队伍
7. 运行能力
- 8.
- 9.

- Accessions to the Collection
- Preservation procedures used
- Stock Control of the Preserved Organisms
- Supply
- Confidentiality
- Staff - Qualifications and Training
- Quality Audit and Quality Review
- Quality Control System
- Equipment: Calibration, Testing and Maintenance
- Measurement Traceability and Calibration
- Methods and Procedures
- Laboratory Accommodation and Environment
- Receipt and Handling of Organisms
- Record system
- Handling of Complaints and Anomalies
- Outside Support Services and Supplies
- Site Security
-



- OECD Best Practice Guidelines for Biological Resource Centers (2007)
- WFCC Guidelines 3rd Edition (2010)
- ISO20387-2018: 生物样本库质量和能力通用要求
- WS 315-2010: 人间传染的病原微生物菌（毒）种保藏机构设置技术规范



- 资源收集、保藏、质控、共享管理的标准化、规范化
- 为科研、生产、教育等提供高质量的微生物资源

小结二

- ❖ **承诺长期的菌种保藏工作**
- ❖ **深刻理解提供正确菌种的重要性，清楚认识到对所有收到的菌（毒）种培养物都要经过认真复核鉴定，证实其鉴定结果**
- ❖ **服务性菌种保藏中心应充分认识和接受其职责——公共服务必须达到一定的标准**

**THANKS FOR YOUR
ATTENTION**

