

超速离心机制备冷冻干燥保存菌种

黄元桐 崔杰

(山西省中医研究所, 太原 030012)

摘要 利用超速离心机原有的冷冻系统和真空系统进行冷冻干燥的方法冻干保存了39种国际标准菌种, 4℃保存一年后, 随机检测了其中的18种, 全部存活良好。用本法还可以制备出1、2、3、10ml不同容量的冷冻干燥生物制剂, 适用于中批量各种冻干生物制剂的生产和研究。一机两用, 省资金, 省用房, 提高了机器的利用率。

关键词 超速离心机, 冷冻干燥, 菌种保存

细菌在普通培养基中保存一般需要每月传代一次, 而且容易发生污染和变异。保存菌种最理想的方法为冷冻干燥法, 可以保存几年、几十年或者更长的时间, 而且可以避免污染和变异^[1]。但是, 冷冻干燥设备昂贵, 不是每一个必需的单位都能装备上, 至使该法不能普遍应用。我们通过试验发现, 利用超速离心机原有的低温冷冻系统和真空抽气系统, 不加任何改装, 可以完成冷冻干燥过程, 制备出冷冻干燥菌种, 效果良好。提供了一个一机多用的冷冻干燥方法。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌种: 由中国药品生物制品检定所菌种保存中心提供, 均为国际标准菌种。

1.1.2 培养基: 普通营养琼脂培养基。

1.1.3 超速离心机: 日立80P-7型超速离心机 (Preservative centrifuge)

1.1.4 高频探漏仪: GP1型, 北京仪器厂出品。

1.2 方法

1.2.1 新鲜脱脂牛乳的制备: 制备冷冻干燥菌种需用脱脂牛乳作保护剂。制备方法: 取4℃保藏的新鲜牛乳一袋, 3000r/min离心沉淀10min去除油脂层。取此脱脂牛乳分装于中试管, 经0.70kg/cm²高压蒸汽灭菌, 塞上无菌胶塞, 4℃冰箱存放备用。

1.2.2 菌液制备: 将要冷冻干燥的菌种接种于营养琼脂斜面, 37℃培育18—24h。刮取菌苔放

入3—5ml 无菌脱脂牛乳中制成浓菌液(每毫升约含20亿个菌以上), 按0.1—0.2ml量分装于安瓿管中, 进行冷冻干燥。

1.2.3 冷冻干燥操作程序:

(1) 预冷: 检查机器, 将各转钮调置于0位。将低限温度指针(绿针)调至最低处, 将高限温度指针(红针)调至-10℃处。接上电源, 打开总开关和冷冻机开头, 使槽内温度下降。约20min, 槽内温度可降至-30℃, 温度指针(黑针)到达最低处。

(2) 菌种速冻: 当槽内温度到达-30℃以下时, 启开冷冻槽平盖, 迅速放入装有牛乳菌液的安瓿管, 并盖严平盖, 继续冷冻2h。

(3) 冷冻干燥: 打开真空泵, 在-30℃下抽气干燥2h。将低限温度指针上调至-4℃, 上限温度指针上调至+5℃, 继续抽气干燥2h。将低限温度指针上调至18℃, 上限温度指针上调至24℃, 继续抽气干燥4h, 冷冻干燥完毕。每次使用后, 部分水气成为水珠下沉于油槽底部, 需从油槽下端换油孔的透明胶管中放出。当放尽水珠后, 补上一些新油即可再次使用。

(4) 封口, 加签: 关闭真空泵和冷冻机, 打开冷冻槽平盖, 取出冻干的安瓿管。冷冻干燥良好的菌种管原体积不变, 呈白色干燥结构, 将安瓿管逐个插入真空抽气机的多头皮管上, 用本生灯或安瓿封口灯火焰逐支封口。按菌种名称

和批号贴上标签,置菌种盒于4℃冰箱保存待用。

(5) 检测:用GP1型高频探漏仪探测每支菌种管的真空度。真空度良好的菌种管会发蓝色荧光。探测时间不宜过长,以免影响菌种活力。活菌试验:打开安瓿管,加入少量肉汤培养基,融化后取一滴接种于营养琼脂斜面上,或其他适宜培养基上,放37℃温箱中培育24—48h,观察细菌的存活情况及其纯度。

2 结果和讨论

2.1 超速离心机制备冷冻干燥菌种

两年中用此法冷冻干燥国际标准菌种30种,包括痢疾杆菌、沙门氏杆菌、假单胞菌、埃希氏菌、链球菌、亚利桑那沙门氏菌等属的细菌。冻干保存一年后随机测试了18种冻干的菌种,即:志贺氏痢疾杆菌、宋内氏痢疾杆菌、福氏痢疾杆菌、伤寒杆菌、肠炎沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、甲型链球菌、绿脓杆菌、克雷伯氏肺炎杆菌、致病性埃希氏大肠杆菌、亚利桑

那菌、弗兰地柠檬酸杆菌和腊状杆菌。结果全部生长良好。

2.2 超速离心机冻干其他生物制剂

实验证明,使用此法将冷冻干燥时间延长到14h,还可以冻干较大容量的各种生物制剂。我们以人血清和脱脂牛乳做试验,5ml安瓿装量1ml,10ml安瓿装量2ml,底面积25×45mm的组织培养瓶装量3ml,底面积55×85mm的组织培养瓶装量10ml,平放冷冻干燥14h,可以制出良好的冻干产品。

由于本机冷冻槽较大,真空泵效力较高,使用本机不仅可以冻干菌种,使之长期保存,而且还适用于中批量的冻干生物制剂的研究和生产,包括生物制剂,生物药品和其他生物制品的研究和生产。一机两用,可以节省资金和用房,提高机器的利用率。

参 考 文 献

- [1] Heckley R J. *Adv Appl Microbiol*, 1961, 3: 1.

PREPARATION OF LYOPHILIZED BACTERIA STRAINS BY ULTRACENTRIFUGE

Huang Yuantong Cui Jie

(Shanxi Institute of Traditional Chinese Medicine, Taiyuan 030012)

Abstract Utilizing the vacuum and deep-freeze systems of an ultracentrifuge, 30 bacteria strains including *Shigella*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Staphylococcus* were successfully lyophilized and well kept in a 4℃ refrigerator for more than one year. The detailed procedure of this lyophilization method is described. This is a simple and economic method that could be used for lyophilization of biologic products and reagents in clinical laboratory or in medical research works.

Key words Ultracentrifuge, Lyophilization, Preservation of bacteria