

一种用于冻结保藏菌种的控制冷却速率的装置*

马德江 元伟 李钟庆

(中国科学院微生物研究所,北京)

用液氮作致冷剂,将菌种冻结在超低温状态下(-150° 至 -196°C)加以保存,是近年来一些菌种保藏机构所采取的一种手段。使用该法保藏菌种,除需要一定设备外,还必须解决冻结菌种悬液时冷却的速率。因为,如果将菌种悬

液直接放入液氮生物贮存罐中冻结,则属快速冻结,其冷却速率为 $450^{\circ}\text{C}/\text{分钟}^{[1]}$ 。而快速冻结时由于在细胞内产生大量冰晶,致使细胞死

* 董怀刚,王冀同志协助工作。

亡或损伤。为了降低冻结后细胞的死亡率,许多工作者曾进行过试验。比较一致地认为慢速冻结,快速解冻(融化)可减少死亡。所谓慢速冻结,即控制冻结时冷却的速率,使每分钟降低温度 1—4℃ (因微生物种类而异),待降至 -40℃ 后,称为预冻,再立即将预冻的菌种放入液氮生物贮存罐中保存。快速解冻,是指从液氮生物贮存罐中取出冻结的菌种后,立刻放入 38℃ 恒温水浴中融化 5—10 分钟即完成解冻。

关于控制冷却速率一事,各工作者大都只谈结果,很少详述所采用的具体措施。已知的方法是采用干冰丙酮浴^[2]或乙二醇浴^[3]。然而用这样冷浴慢速冻结样品,只能随其自然降温速率。我们在实验中经过多次试验,设计出一种装置,可以灵活地控制冷却速率。该装置由二部分组成:其一是 10L 的液氮生物贮存罐(以下简称罐),其二是 4L 的杜瓦瓶(即冷藏瓶,下同)。罐内盛 2—3 L 液氮作为致冷的动力。罐口用塞固定三个内径皆 3mm 的铜管:一个接三通活塞及打气球,以便调节罐内的压力;一个接血压计用的压力表;一个接内径 4mm 的塑料导管与通杜瓦瓶中铜管(内径 3mm) 相联,塑料

导管长度为 45cm。在杜瓦瓶内放置一铜制安瓿架,以便安放冻结的样品。另外再注入 1L 95% 乙醇,作为冷浴。杜瓦瓶口加泡沫塑料盖且固定联导管的铜管、-80℃ 温度计及排气管等。该装置的平面结构如图 1 所示。此装置可以从室温将乙醇温度降至 -40—-60℃,而且可以控制降温的冷却速率为 1—4℃/分钟。

工作原理:当罐内注入液氮后,汽化了的氮气可以从三通管排气口逸出。罐内液氮处于常压状态,液氮自然汽化,而不输出。当需要用它致冷时,关闭三通排气口,用手捏打气球向罐内施加压力,加之液氮汽化了的氮气不能逸出,罐内压力增加,致使少量的液氮通过导管而输入杜瓦瓶中,冷却乙醇,使乙醇温度由室温逐渐降低。由于乙醇的凝固点为 -130℃,所以乙醇不会结冰而保持液体状态。又由于乙醇的温度高于液氮,所以在杜瓦瓶中乙醇可以加速液氮汽化,而汽化的氮气气泡,可使杜瓦瓶中的乙醇温度均一,这一装置使罐内压力与杜瓦瓶中乙醇冷却速率成正比。所以在罐内保持一定压力下,液氮不间断地缓缓流入杜瓦瓶中,如此而实现所需要的冷却速率。

使用方法:(1)将一定量的(约 1L)95%乙醇注入杜瓦瓶中,(2)将容有欲冻样品(包括保护剂,均为水溶液,其量由 0.2ml 至 5ml 都可用

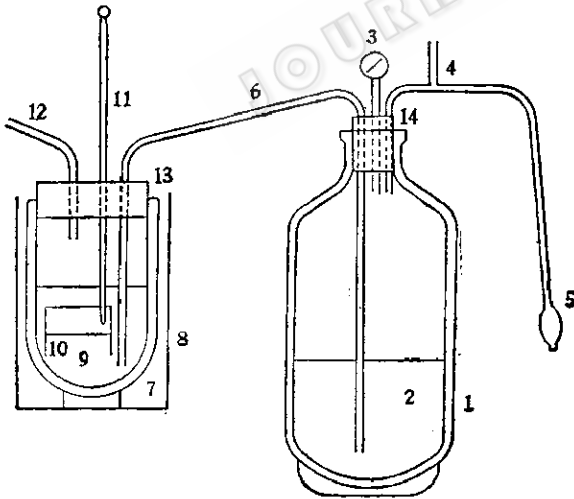


图 1 控制冷却速率的装置

1. 液氮生物贮存罐(10L), 2. 液氮, 3. 压力表, 4. 三通排气管, 5. 手捏式打气球, 6. 塑料导管, 7. 4L 杜瓦瓶, 8. 杜瓦瓶外壳, 9. 95% 乙醇, 10. 安瓿架, 11. -80℃ 温度计, 12. 排气管, 13. 泡沫塑料盖, 14. 橡皮塞。

表 1 控制冷却速率的试验结果 (4℃/分钟)

计时(分、秒)	罐内压力 mmHg	温度(℃)
0	15—30	20
3'15"	15—30	16
4'35"	35—40	12
5'50"	35—40	8
6'55"	35—40	4
8'00"	35—40	0
9'05"	35—40	-4
10'30"	35—40	-10
11'25"	35—40	-14
12'25"	35—40	-18
13'30"	40—46	-22
14'30"	40—46	-26
15'25"	40—46	-30
16'25"	40—46	-34
18'18"	40—46	-42

此装置进行预冻) 的安瓿放入乙醇中的安瓿架上, (3)将 2—3 l 液氮注入罐中, 开启三通排气口, (4)将塑料导管插入杜瓦瓶中, (5)关闭三通排气口, (6)手捏打气球向罐内通入空气来调节罐内压力, 保持在 15—30mmHg, (7)观察降温速度, 并调节至所需要的速度, (8)用后开启三通排气口, 取下导管, (9)打开杜瓦瓶盖, 取出样品, 立即放入液氮生物贮存罐中冻结保存。

我们曾利用该装置进行多次试验, 结果都比较理想, 可控制降温速率分别为 1—4°C/分钟, 仅列一例于表1。

参 考 文 献

- [1] Barnhart, E. R. and C. E. Terry: *Cryobiology*, 8: 323—327, 1971.
- [2] Jansden, D. W. and F. F. Busta: *Cryobiology*, 10: 386—392, 1973.
- [3] Ray, B., M. L. Speck, and W. J. Dobrogosz: *Cryobiology*, 13: 153—160, 1976.