

\*标准\*指南\*共识\*

开放科学  
(OSID)

# 《预防性生物制品用病原微生物菌(毒)种低温保藏技术指南》标准解读

赵元元<sup>1</sup>, 郭宁<sup>2</sup>, 姜孟楠<sup>1</sup>, 胥义<sup>2</sup>, 魏强<sup>1</sup>

**摘要:** 2023 年 4 月 10 日, 中国疫苗行业协会和中国标准化协会联合发布并实施《预防性生物制品用病原微生物菌(毒)种低温保藏技术指南》(T/CAV 002—2023、T/CAS 714—2023)。这是贯彻落实《中华人民共和国生物安全法》《人间传染的病原微生物菌(毒)种保藏机构“十四五”发展规划》中提出构建国家生物安全标准体系的重要体现。标准以病原微生物资源长期、稳定、安全保藏技术需求为出发点, 首次明确了低温保藏定义, 以及冷藏保藏、超低温保藏、深低温保藏、冷冻干燥保藏 4 种低温保藏方式及其定义和操作流程。标准的发布实施, 将为确保国家生物资源保藏安全提供技术支撑, 同时, 也将推动低温生物学基础研究和关键技术与产品研发, 助力疫苗研发等生物产业发展和生物科技创新。本文从标准编制背景、标准结构与主要内容、标准应用与展望 3 个方面对标准进行全面的解读, 使标准使用者对标准的内容和作用有准确的理解, 支撑标准的宣贯与实施。

**关键词:** 病原微生物菌(毒)种; 低温保藏; 指南; 标准解读

中图分类号: R211; R37; R939.99

文献标志码: A

文章编号: 1003-9961(2023)12-1432-04

**Interpretation for the standard of Technical Guidelines for Low Temperature Preservation of Pathogenic Microorganisms for Prophylactic Biological Products** Zhao Yuanyuan<sup>1</sup>, Guo Ning<sup>2</sup>, Jiang Mengnan<sup>1</sup>, Xu Yi<sup>2</sup>, Wei Qiang<sup>1</sup>. 1. National Pathogen Resource Center, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China; 2. Institute of Biothermal Science and Technology, University of Shanghai for Science and Technology, Shanghai 200093, China

**Corresponding authors:** Xu Yi, Email: xuyi@usst.edu.cn; Wei Qiang, Email: weiqiang@chinacdc.cn

**Abstract:** Technical Guidelines for Low Temperature Preservation of Pathogenic Microorganisms for Prophylactic Biological Products (T/CAV 002—2023, T/CAS 714—2023) have been implemented since April 10, 2023 which released by China Association for Vaccines and China Association for Standardization. This is one of the concrete and important measures to implement Biosafety Law of the People's Republic of China, the National Health Commission of the Pathogenic Microorganisms of Collection Organization of the “14<sup>th</sup> Five-Year” Development Plan and to improve the standard system of biosafety in China. Based on the technical requirements of long-term, stable and safe preservation of pathogenic microorganism resources, the standard defines the low-temperature preservation for the first time, and refrigerated preservation, ultra-low temperature preservation, deep cryogenic preservation, freeze-drying preservation and other four low-temperature preservation methods and their definitions and operating procedures. The release and implementation of the standard will provide technical support to ensure the safety of national biological resources storage, and will also promote cryobiology basic research and the key technologies and products development, supporting the development of biological industry and biotechnology innovation such as vaccine research and development. In this paper, the background of standard compilation, the structure and main content of standard, and the application and prospect of standard are interpreted particularly, so that standard users can have a clearer understanding of the content and far-reaching significance of standard, and help the publicity and implementation of standard.

**Key words:** Pathogenic microorganism; Low temperature preservation; Guidelines; Standard interpretation

**This study was supported by the National Key Research and Development Program of China (No. 2022YFC2602200) and the National Science and Technology Infrastructure of China (No. National Pathogen Resource Center-NPRC-32)**

2023 年 4 月 10 日, 中国标准化协会和中国疫苗行业协会联合发布并实施《预防性生物制品用病

原微生物菌(毒)种低温保藏技术指南》(T/CAV 002—2023、T/CAS 714—2023, “标准”)。标准是贯彻落实《中华人民共和国生物安全法》《人间传染的病原微生物菌(毒)种保藏机构“十四五”发展规划》, 健全国家病原微生物保藏标准体系和国家生物安全标准体系的重要组成部分, 将为确保国家生物资源保藏安全提供关键技术支撑。

病原微生物菌(毒)种是生物资源的重要组成部分, 广泛应用于疾病控制、食品工业、生物制品、医疗保健等多个领域<sup>[1-2]</sup>。为保护微生物资源多样性并促进其有效利用, 通常采用干燥、低温、缺氧、光照控

基金项目: 国家重点研发计划(No. 2022YFC2602200); 国家科技资源共享服务平台项目(No. 国家病原微生物资源库-NPRC-32)

作者单位: 1. 中国疾病预防控制中心, 国家病原微生物保藏中心/国家病原微生物资源库, 北京 102206; 2. 上海理工大学生物系统热科学研究所, 上海 200093

作者简介: 赵元元, 女, 北京市人, 中级标准化工程师, 主要从事病原微生物资源保藏与标准体系工作, Email: zhaoyy@chinacdc.cn

通信作者: 胥义, Email: xuyi@usst.edu.cn; 魏强, Email: weiqiang@chinacdc.cn

收稿日期: 2023-09-18 网络出版日期: 2023-11-27

制等措施,通过减缓微生物菌(毒)种在受控环境中的代谢、抑制其生长繁殖,将其置于半休眠或完全休眠的状态,从而实现有效保存的目标<sup>[3-4]</sup>。经过实践验证,基于低温生物学原理的冷冻保存技术能够维持微生物菌(毒)种的高活性和遗传稳定性,是实现生物资源高质量和长期保存的重要方法<sup>[5-6]</sup>。

### 1 标准编制背景

1.1 确保生物资源安全 保障国家生物资源安全,是国家生物安全工作的重要组成部分,也是满足科研和产业发展等重大需求的关键要素。当前,国家病原微生物保藏中心/国家病原微生物资源库已初步构建了一个系统性的标准体系,以支持病原微生物资源保藏工作。这一标准体系以实物资源、数据资源、机构建设与管理 3 个方面为基础,贯穿资源收集、鉴定、编目、保存、销毁和提供等全流程<sup>[7-9]</sup>。本标准是围绕实物资源保藏,提升资源质量、确保资源安全为重点的一项技术指南,是完成资源采集、鉴定、入库后保藏的重要技术环节。本标准与国家病原微生物保藏标准体系中的数据描述规则、国家标准株评价、机构设置技术规范等其他标准做了相应的衔接和互补。

1.2 以低温生物学基本原理为基础 低温生物学是生物科学的一个分支领域,是专门研究 0℃ 以下或接近 0℃ 的低温对生物体所产生的影响及其应用的学科,包括自然状态下生物耐寒性理论研究和通过冷冻保存维持生物样本存活状态的应用研究<sup>[10]</sup>。2022 年 5 月 10 日,国家发展改革委发布《“十四五”生物经济发展规划》中明确提出,积极发展低温生物学等保存技术,提升资源长期保存能力<sup>[11]</sup>。本

标准建立在低温生物学基本原理之上,明确了低温保藏等有关定义,以及 4 个低温温度范围,并根据低温保藏过程中降温 and 升温两个关键阶段的影响因素,提出了相关技术指标和要求。

1.3 以相关科研数据为支撑 制定标准应当在科学技术研究成果和社会实践经验的基础上,深入调查论证,广泛征求意见,保证标准的科学性、规范性、时效性,提高标准质量<sup>[12]</sup>。因此,本标准是在传染病防治重大项目、国家重点研发专项等科研课题支持下,运用低温生物学理论和方法,针对不同种类菌(毒)种的生物学特性,从微生物菌(毒)种的形态结构、低温保护剂的筛选、升降温速率的控制、保藏温度的选择等多个影响因素角度,开展系统性评价后,以研究数据为基础而制定的<sup>[13-14]</sup>。

### 2 标准结构与主要内容

2.1 基本框架 标准适用于病原微生物菌(毒)种保藏中心、保藏专业实验室等保藏机构,以及涉及病原微生物菌(毒)种保管、使用和疫苗生产企业等单位。标准包括了前言、范围、规范性引用文件、术语和定义、保藏基本要求、冷藏保藏、超低温保藏、深低温保藏、冷冻干燥保藏 9 个部分,以及常用低温保护剂和常用冻干保护剂 2 个资料性附录。标准框架见图 1。

2.2 主要内容 标准规定了预防性生物制品用病原微生物菌(毒)种低温保藏流程和技术要求,包括保藏基本要求,冷藏保藏、超低温保藏、深低温保藏、冷冻干燥保藏等流程及相关要求。

2.2.1 标准明确了一个低温保藏的定义和 4 种低温保藏的类型 标准术语和定义中明确,低温保藏是

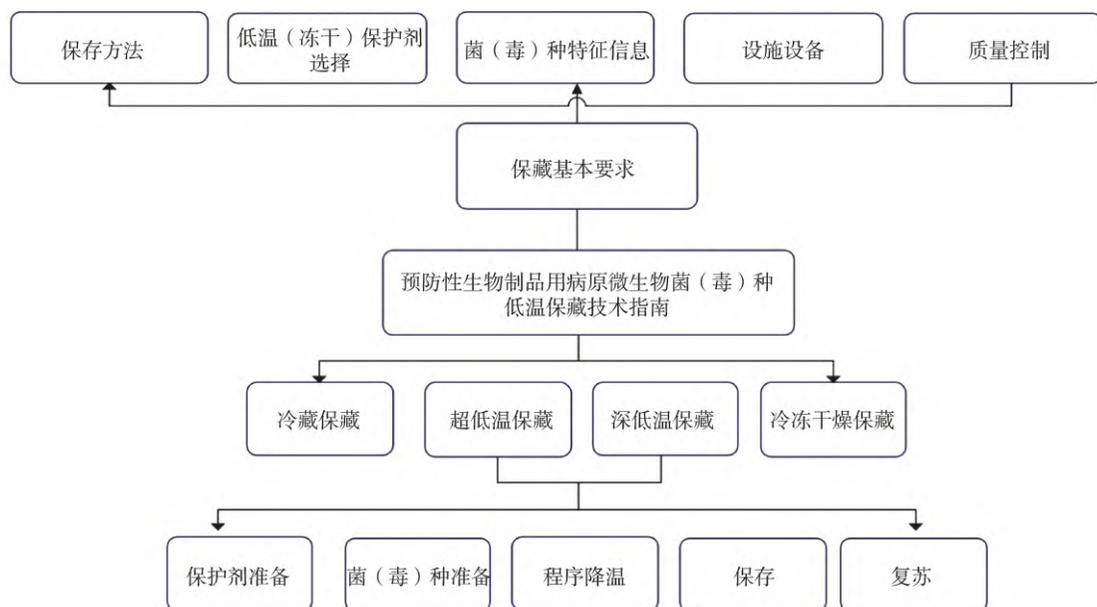


图 1 《预防性生物制品用病原微生物(毒)种低温保藏技术指南》标准框架

Figure 1 Standard framework of Technical Guide for Low Temperature Storage of Pathogenic Microorganisms for Preventive Biological Products

指在低温条件下保存菌(毒)种,使其代谢水平降低乃至完全停止生长繁殖,达到半休眠或完全休眠状态的技术方法。低温保藏条件包括冷藏(2~8℃)、低温(-20~-40℃)、超低温(-60~-80℃)、深低温(-150~-196℃)4个温度范围。同时,标准中也分别明确了4种低温保藏的类型和定义,包括冷藏保藏、超低温保藏、深低温保藏、冷冻干燥保藏。

2.2.2 标准提出了低温保藏的5个方面基本要求和5个关键技术环节 标准提出,低温保藏应满足信息要求、低温(冻干)保护剂选择、设施设备、保存方法、质量控制5个方面基本要求。同时,标准规定了病原微生物菌(毒)种低温保藏流程和技术要求,并分别从菌(毒)种筛选、低温(冻干)保护剂选择、程序降温、保存、复苏5个关键技术环节提出标准化要求。

2.2.3 附录 本标准在标准正文基础上,增加了“常用低温保护剂”和“常用冻干保护剂”两份附录。其中,附录A分别从“病毒”“细菌”“真菌”三类病原微生物出发列举已使用过的常用低温保护剂,如:二甲基亚砜、甲醇等;附录B分别从糖/醇类、聚合物类等冻干保护剂种类中遴选出63种常用冻干保护剂。两份清单清晰明了,供标准使用者参考并选择应用。

### 3 标准应用与展望

3.1 加强标准宣传与国内外推广使用 随着国家病原微生物保藏机构“十四五”规划实施,我国将进一步完善保藏体系布局,推进保藏机构建设发展,逐步形成我国病原微生物资源保藏体系。作为国家病原微生物资源保藏标准体系的重要组成部分,加强并推广使用标准,规范我国涉及病原微生物菌(毒)种低温保藏的技术流程和关键技术要素,将逐步夯实我国各级各类保藏机构资源安全基础,提升我国病原微生物资源保藏能力和质量。同时,应积极通过国际合作途径,将标准转化为英文版本或者国际标准,在支持非洲等中低收入国家资源安全中发挥中国技术作用。

3.2 推动和加强低温保藏基础应用研究 低温技术的广泛应用,尤其是在建设生物样本库以冷冻保存人体细胞、组织和器官等重要生物材料方面的不可替代性,赋予了低温生物学新的内涵<sup>[15]</sup>。然而,低温生物学领域尚面临着诸多挑战,包括但不限于揭示分子水平的低温损伤机制、研发低毒且高效的低温保护剂、突破大尺寸生物样本的尺寸限制以及优化新型复温策略等<sup>[16-17]</sup>。因此,以标准为起点和推动力,深入系统研究影响因素的机理,通过技术创新开发更安全、更高效的低温保存方法,推动低温保藏

技术可持续发展,为标准实施提供更多理论和技术支撑。

3.3 支撑和促进低温保藏新技术新产品研发 有必要综合分析菌种低温保存相关的影响因素,深入研究冰晶对不同细胞结构的菌种造成的损伤情况,以及菌种在分子水平上应对低温环境的生长调控等关键问题。通过更好的理解低温条件下的生物学特性,重点研发具有高度针对性的病原微生物菌(毒)种低温保护剂及保藏相关关键技术和产品,为长期保藏和充分利用病原微生物菌(毒)种资源提供重要保障<sup>[6]</sup>。同时,自动化样本存储系统的研发应充分整合与低温保护剂方案、冷冻工艺、复温工艺等紧密相关的要素,更好实现珍贵生物样本的个性化低温保存管理。这是推动大型高质量保藏机构建设和发展的重要步骤,将为科学研究和应用领域提供关键支持<sup>[18]</sup>。

病原微生物菌(毒)种是国家重要战略生物资源,病原微生物资源标准化与利用工作提高其保藏质量是保藏工作的基础,也是确保资源安全和可持续利用的前提。因此,将低温生物学理论与方法创新应用于菌(毒)种保藏领域,对推动病原微生物资源保藏工作高质量发展具有重要意义。本标准是病原微生物资源保藏领域第一个双编号标准,是贯穿研究、技术、产品,实现全链条科研产出的一次有益探索,为细化、丰富、完善标准体系又迈出了重要一步。

当然,低温生物学领域仍有一些亟需解决的问题,例如如何开发低毒环保的低温保护剂并揭示其作用机理<sup>[19]</sup>,如何优化创新的玻璃化保存方法及设备<sup>[20]</sup>,如何探索复杂组织器官玻璃化保存的多尺度损伤机制<sup>[21]</sup>,以及如何设计活体生物样本复温策略等<sup>[22]</sup>。这就需要整合材料科学、化学与生物技术、低温生物医学以及工程制造等不同领域的尖端技术,以病原微生物资源保藏等应用需求为导向,深度跨学科交叉合作,集中精力进行基础研究和应用开发,以解决高质量保存生物样本瓶颈问题,推动我国生物经济行业的迅速发展<sup>[16]</sup>。相信在此过程中,通过各方面支持,也将会有更多的标准产出,为进一步健全国家病原微生物资源保藏标准体系,助力国家生物安全发挥积极作用。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参考文献

- [1] Anand U, Vaishnav A, Sharma S K, et al. Current advances and research prospects for agricultural and industrial uses of microbial strains available in world collections[J]. *Science of The Total Environment*, 2022, 842: 156641. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2022.156641.
- [2] Rani A, Saini K C, Bast F, et al. A review on microbial products and their perspective application as antimicrobial agents[J].

- Biomolecules*, 2021, 11(12): 1860. DOI: 10.3390/biom11121860.
- [3] De Vero L, Boniotti MB, Budroni M, et al. Preservation, characterization and exploitation of microbial biodiversity: The perspective of the Italian network of culture collections[J]. *Microorganisms*, 2019, 7(12): 685. DOI: 10.3390/microorganisms7120685.
- [4] Jain A, Jain R, Jain S, et al. Preservation of microorganisms: Stabs, slants, lyophilization and cryopreservation[J]. *Basic Techniques in Biochemistry, Microbiology and Molecular Biology: Principles and Techniques*, 2020: 105–110. DOI: 10.1007/978-1-4939-9861-6\_30.
- [5] Chen M, Huo X, Wang W, et al. Cryopreservation of infant gut microbiota with natural cryoprotectants[J]. *Biopreservation and Biobanking*, 2022, 20(2): 138–48. DOI: 10.1089/bio.2021.0029.
- [6] Guo N, Wei Q, Xu Y. Optimization of cryopreservation of pathogenic microbial strains[J]. *J Biosafety Biosecurity*, 2020, 2(2): 66–70. DOI: 10.1016/j.job.2020.11.003.
- [7] Jiang M, Liu B, Wei Q. Pathogenic microorganism biobanking in China[J]. *Journal of Biosafety and Biosecurity*, 2019, 1(1): 31–3. DOI: 10.1016/j.job.2018.12.013.
- [8] 魏强, 刘剑君. 推进国家病原微生物资源保藏标准体系建设[J]. *中华实验和临床病毒学杂志*, 2021, 35(5): 484–486. DOI: 10.3760/cma.j.cn112866-20210309-00043.
- Wei Q, Liu JJ. Promote the construction of national standard system for the preservation of pathogen resources[J]. *Chin J Exp Clin Virol*, 2021, 35(5): 484–486. DOI: 10.3760/cma.j.cn112866-20210309-00043.
- [9] Kozlakidis Z, Vandenberg O. Maintaining a focus on biobanking science and innovation[J]. *Biopreservation and Biobanking*, 2022, 20(3): 209–210. DOI: 10.1089/bio.2022.29108.zjk.
- [10] 华泽钊, 任禾盛. 低温生物医学技术[M]. 北京: 科学出版社, 1994. Hua ZZ, Ren HS. *Cryobiomedical techniques*[M]. Beijing: Science Press, 1994.
- [11] 国家发展改革委. 国家发展改革委关于印发《“十四五”生物经济发展规划》的通知: 发改高技〔2021〕1850号[EB/OL]. (2021-12-20) [2023-07-31]. [https://www.gov.cn/zhengce/zhengceku/2022-05/10/content\\_5689556.htm](https://www.gov.cn/zhengce/zhengceku/2022-05/10/content_5689556.htm). National Development and Reform Commission. Notice of the National Development and Reform Commission on the issuance of the “14<sup>th</sup> Five-Year Plan” for Bioeconomic Development (Development Reform High-tech〔2021〕No. 1850)[EB/OL]. (2021-12-20) [2023-07-31]. [https://www.gov.cn/zhengce/zhengceku/2022-05/10/content\\_5689556.htm](https://www.gov.cn/zhengce/zhengceku/2022-05/10/content_5689556.htm).
- [12] 中华人民共和国标准化法(中华人民共和国主席令第七十八号)[EB/OL]. (2017-05-19) [2023-07-31]. [http://www.gov.cn/zhengce/content/2017-05/19/content\\_5195283.htm](http://www.gov.cn/zhengce/content/2017-05/19/content_5195283.htm). Standardization Law of the People's Republic of China (Decree of the President of the People's Republic of China No. 78) [EB/OL]. (2017-05-19)[2023-07-31]. [http://www.gov.cn/zhengce/content/2017-05/19/content\\_5195283.htm](http://www.gov.cn/zhengce/content/2017-05/19/content_5195283.htm).
- [13] Xiao Y, Huang P, Huang Z, et al. Influencing factors on the preservation of lytic bacteriophage VP3[J]. *Biosafety and Health*, 2022, 4(5): 314–20. DOI: 10.1016/j.bsheat.2022.06.004.
- [14] Guo N, Song Y, Yan J, et al. The Effect of Cryopreservation on the Survival of *Nocardia farcinica* and *Yersinia pestis* vaccine strains[J]. *Biopreservation and Biobanking*, 2023, 21(4): 397–406. DOI: 10.1089/bio.2022.0049.
- [15] Ahmed FE. Biobanking perspective on challenges in sample handling, collection, processing, storage, analysis and retrieval for genomics, transcriptomics and proteomics data[J]. *Anal Methods*, 2011, 3(5): 1029–1038. DOI: 10.1039/c0ay00544d.
- [16] 胥义, 郭宁, 杨国梁, 等. 生物样本库建设中的低温生物学[J]. *中国科学: 生命科学*, 2023, 53(7): 1021–1034. DOI: 10.1360/SSV-2022-0171.
- Xu Y, Guo N, Yang GL, et al. Cryobiology for biobanking (in Chinese) [J]. *Sci Sin Vitae*, 2023, 53(7): 1021–1034. DOI: 10.1360/SSV-2022-0171.
- [17] 赵佐舜, 刘宝林. 低温保存技术在生物样本库中的应用[J]. *制冷技术*, 2020, 40(1): 66–71. DOI: CNKI:SUN:ZLJS.0.2020-01-014.
- Zhao ZS, Liu BL. Application of cryopreservation technology in biobank (in Chinese)[J]. *Chinese Journal of Refrigeration Technology*, 2020, 40(1): 66–71. DOI: CNKI:SUN:ZLJS.0.2020-01-014.
- [18] 明星, 周学迅. 自动化在生物样本库中的应用现状[J]. *中国医药生物技术*, 2015, 10(6): 498–500. DOI: 10.3969/j.issn.1673-713X.2015.06.005.
- Ming X, Zhou XX. Application status of automation in biobank[J]. *Chin Med Biotechnol*, 2015, 10(6): 498–500. DOI: 10.3969/j.issn.1673-713X.2015.06.005.
- [19] Chang T, Zhao G. Ice inhibition for cryopreservation: materials, strategies, and challenges[J]. *Advanced Science*, 2021, 8(6): 2002425. DOI: 10.1002/advs.202002425.
- [20] 张宵敏, 周新丽. 最小体积法玻璃化保存的研究进展[J]. *制冷学报*, 2018, 39(4): 63–8+88. DOI: CNKI:SUN:ZLXB.0.2018-04-011.
- Zhang XM, Zhou XL. Research progress in vitrification by minimum volume method[J]. *Journal of Refrigeration*, 2018, 39(4): 63–8+88. DOI: CNKI:SUN:ZLXB.0.2018-04-011.
- [21] Sharma A, Rao J S, Han Z, et al. Vitrification and nanowarming of kidneys[J]. *Advanced Science*, 2021, 8(19): 2101691. DOI: 10.1002/advs.202101691.
- [22] Cao Y, Hassan M, Cheng Y, et al. Multifunctional photo-and magnetoresponsive graphene oxide-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanocomposite-alginate hydrogel platform for ice recrystallization inhibition[J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2019, 11(13): 12379–88. DOI: 10.1021/acsami.9b02887.



赵元元

ORCID: 0000-0002-5892-5204

## 作者贡献:

赵元元: 文献检索、数据收集与分析、论文撰写

郭宁: 文献检索、数据复核、论文撰写

姜孟楠: 技术指导、论文修改

胥义: 论文框架与思路设计与指导、论文修改

魏强: 论文框架与思路设计与指导、论文修改

本文创新点和学术评论句见开放科学(OSID)平台, 欢迎扫描开放科学(OSID)二维码, 与作者开展交流互动

引用本文: 赵元元, 郭宁, 姜孟楠, 等. 《预防性生物制品用病原微生物(毒)种低温保藏技术指南》标准解读[J]. *疾病监测*, 2023, 38(12): 1432–1435. DOI: 10.3784/jbjc.202309180480

Zhao YY, Guo N, Jiang MN, et al. Interpretation for the standard of Technical Guidelines for Low Temperature Preservation of Pathogenic Microorganisms for Prophylactic Biological Products[J]. *Dis Surveill*, 2023, 38(12): 1432–1435. DOI: 10.3784/jbjc.202309180480

(本文编辑: 杨小平)