

样品低温保存 技术手册



NALGENE

NUNC™

合作伙伴:

ATCC®

样品低温保存技术手册

Nalge Nunc International

由 Nalge Nunc International 公司与 Frank P. Sinione, 理学硕士 (Master of Science), 美国菌种保藏中心 (ATCC) 合作撰写。

©2006 Thermo Fisher Scientific

目录

简介	1
种批系统 (Seed Lot System)	1
冻存保护剂	2
生物材料准备	2
平衡	4
安瓿瓶和冻存管	4
降温速率	5
样品储存	5
复苏 (解冻)	6
复苏率鉴定	7
在库控制	7
生物材料管理实践	7
安全注意事项	8
细胞培养操作步骤 (非干细胞)	8
精选文献参考	9

简介

为了保证科学研究和生物医学研究的可持续性和实验结果的可重复性，如何保证活细胞和微生物中遗传复制物质的稳定性，以及怎样保持如核酸和蛋白质等亚细胞组分的稳定不变，是当今科学家面临的重大问题之一。细胞传代培养十分耗时，另外，由于极易发生污染或遗传漂变等问题，导致只有越来越少的细胞可用来传代。不恰当的储存和处理不可重复性样品，会导致实验结果的差异性和不可重复性。然而，将部分活细胞或亚细胞组分悬液放置在冻存低温储存，可以达到“暂停时间”的效果，这样便可获得组织材料的遗传稳定性，方便各种实际操作的应用。

作为低温生物学的一项实际应用，在冻存温度使生物材料保持稳定的过程叫做样品低温保存。冻存科技的不断发展，实现了维持不同生物材料的稳定性，如组织材料，各类细胞以及亚细胞组分材料。当前已发展出包括微生物、组织、原代细胞、细胞系、小型多细胞器官，复杂细胞状结构如胚胎，以及核酸和蛋白等材料的冻存技术。

冻存过程涉及很多复杂现象，即使经过了数十年的研究，具体机制仍不甚清楚。冻存生物学的研究主要针对如下问题：活细胞在冻存过程中发生了什么变化？如何克服冻存过程中的不利现象？因为水是所有活细胞的主要组成部分，并且直接影响细胞内生物化学反应。当细胞中所有水分子都转化成冰晶时，细胞的新陈代谢也就停止了。

降温过程中冰晶以不同速率形成。缓慢降温过程中，胞外冰晶先于胞内冰晶形成¹。随着细胞外部冰晶的逐渐形成，胞外环境的水分子减少导致细胞膜内外渗透压不平衡，胞内水分子向胞外迁移。进而导致，细胞内外液体浓度的增加对细胞存活有害¹。所以，如果细胞内保留过多水分子，冰晶形成及重结晶过程会对细胞造成致命伤害。

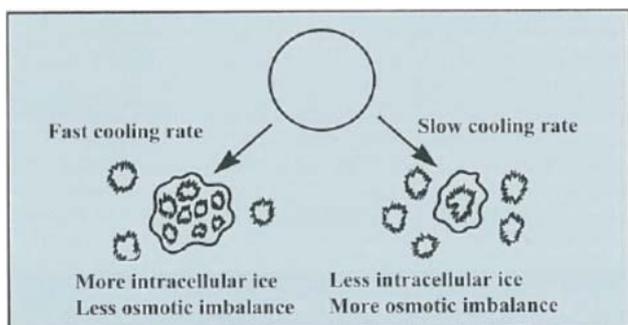


图1 使用1°C/分钟的降温速度和冻存保护试剂，将最小化由渗透压失衡和冰晶形成对细胞造成的损伤

降温速率对细胞冻存具有很大影响（图1）。快速冻存可以大大减少胞内外液体浓度改变造成的影响，使得形成形状规则的冰晶，但是，由于水分子未完全迁移至胞外容易形成较多的胞内冰晶。相反，缓慢冻存可以使得细胞内水分充分渗出，减少胞内冰晶，但是却提高了胞内外液体浓度改变对细胞造成的影响。细胞透性影响水分流失的速率，透性较好的细胞更耐受速冻²。Mazur认为³，冰晶形成和细胞内外液体浓度改变均影响细胞损伤。优化降温速率能同时将二者的影响降到最低。毫无疑问，每分钟降低1°C的降温速率最为合适。

使用冻存保护剂或化学物质可以在冻存的过程中保护细胞，减少细胞内外液体浓度改变和形成冰晶对细胞产生的影响。常用的冻存保护剂是二甲基亚砜（DMSO）和甘油，还有一些其他保护剂用于某些特殊应用。另外，采用合适的储藏温度以及恰当的

复温速率，也有利于降低对细胞和组织产生的伤害。

良好冻存流程的关键因素之一为标准化操作过程。由于冻存操作的复杂性，操作时微小的变化都会对生物材料造成显著的影响。标准化冻存流程可以很大程度地保障实验结果的连续性和可比性。因此，一旦制定了一个成功的冻存流程标准，需要非常仔细的记录此套方法。

种批系统 (Seed Lot System)

为了保证细胞的遗传稳定性，原代细胞培养成稳定细胞系后需尽量减少传代次数。当您进行细胞冻存时，需要建立一个系统确保早期传代的细胞材料始终可以进行传代，产生新的可用细胞。保存早期传代的细胞材料的方法之一是使用种批系统 (Seed Lot System)⁴。

在第一批冻存细胞的准备阶段，需要预留出一部分细胞作为种子材料。这部分细胞被保存于特定冻存管中，且与日常工作用冻存细胞分开放置，防止种子材料被当做工作用冻存细胞使用或进行复苏操作（图2）。当第一批工作用冻存细胞使用完毕后，可从种子材料中取出一支用于生成第二批工作用冻存细胞。以此往复，直到仅剩一支种子材料。最后一支种子材料用于生成第二批种子材料。采用这种方法，第二批种子材料由原代材料算起，仅仅经过1-2次的传代，但如果准备了足够多的种子材料，第一批材料可以使用多年。

种子储备的概念与细胞样本库的操作类似：建立质量合格的主细胞库，通过准备工作用冻存细胞的生产过程不断发展和维护细胞库。类似系统也可以运用于其余非复制性材料，如DNA和蛋白质（不包括有特殊目的的使用）。在这种情况下，由于使用材料的不可更新性，当怀疑工作用冻存材料发生变化时，可用种子储备进行对比实验。所以需要准备足够数量的材料作为种子储备，以便日后检测的需要。

除种子材料之外，部分原代细胞及部分的工作用冻存细胞均需要与其他材料隔离保存。这样，在对其他工作用细胞进行储存和复苏操作时，不会对此部分原代细胞的储存温度造成影响。如果可能的话，最好能在其他区域储存一些原代细胞作为备份材料，这样的储存方式确保在原先冻存装置发生物理灾害时，备份材料也不会丢失。使用种批系统和备份样本储存，是任何管理健全的菌种保存中心保证冻存材料延续性和持久性工作的重中之重。

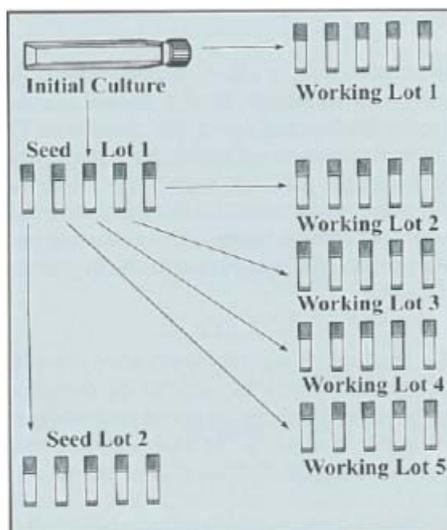


图2 种批系统

冻存保护剂

很多化合物都可以作为冻存保护剂，它们既可以单独使用也可以联合使用，例如糖、血清和去污剂。虽然冻存没有绝对的准则，但是大家普遍认为二甲亚砜（DMSO）和甘油是保护活细胞和组织使用最广泛且最有效的冻存保护剂。其他冻存保护剂可根据情况使用，可单独使用也可联合使用，包括：聚乙烯乙二醇（polyethylene glycol），丙二醇（propylene glycol），甘油（glycerine），聚乙烯吡咯烷酮（polyvinylpyrrolidone），山梨醇（sorbitol），右旋糖苷（dextran），海藻糖（trehalose）。

冻存组织和整个器官的需求，促进了冻存方法的发展，新方法也提高了冻存细胞和有机的复苏^{4, 5}。这些方法包括改变冻存保护剂的浓度和加入添加剂，避免冻存过程引发的细胞凋亡或程序性死亡。多年来人们一直认为，是冻存过程中产生的细胞内物理变化或损坏，造成冻存后细胞的死亡。而最近有研究发现，一些更为精细的胞内活动可能导致了细胞死亡，而这些活动可在一定程度上受控于适当的冻存添加剂。

冻存过程中，冻存保护剂有多种功能。例如，DMSO可以降低冰点，促进细胞在胞内冰晶形成之前脱水更加完全。普遍认为，当冻存保护剂可有效穿透细胞，延迟胞内冰晶形成，降低溶液效应时，冻存保护的效果最佳¹。另外，需要根据冻存的细胞类型来选择冻存保护剂。对绝大多数细胞来说，甘油是更好的选择，因为它的毒性比DMSO小。但是，DMSO具有更好的渗透性，通常作为较大较复杂的细胞冻存，如原生生物。在添加到细胞悬液之前，冻存保护剂应该用新鲜培养基稀释到适宜浓度，这能最小化潜在的化学反应损害，并确保细胞能均一接触到保护剂，减少毒害效应。DMSO和甘油通常使用的浓度范围为5-10%（v/v）。除了用于植物细胞，二者一般不联合使用。

冻存保护剂最优浓度选择根据细胞类型及细胞所能耐受的最高浓度而定。针对某些材料，通过不断增加保护剂浓度来检测细胞的敏感度，有助于挑选出保护剂的最优工作浓度。Quick-Reference Chart（第4页）罗列出针对不同类型细胞所使用保护剂的推荐浓度，并且可以作为选择合适保护剂的参考资料。

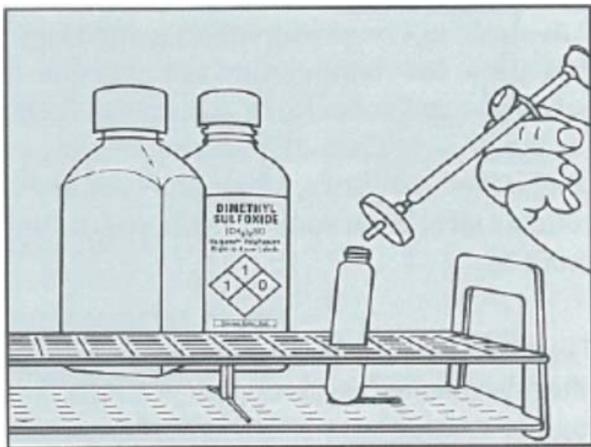


图3 通过过滤方式将DMSO除菌

甘油和DMSO应为试剂级或者更高级别，使用前需灭菌，并检测不良特性。每批号产品均需要进行毒性测试，具体方法为使用之前采用的工作浓度处理敏感细胞，查看毒性影响。保护剂使用前，甘油需在15p，121°C条件下灭菌15分钟并避光保存；DMSO应进行过滤除菌，使用滤膜为0.2微米尼龙滤膜，或经甲醇和DMSO预洗的特氟龙（TeFlon）※PTFE滤膜。保护剂应该

分装成一次性使用体积储存，避免污染和重复使用引入水分。

操作DMSO时需要小心谨慎，因为它能通过皮肤快速吸收收入体内，可能会携带有害物质进入体内。

非复制性材料通常不需要在冻存时加入添加剂（需要保护特殊性状的情况除外）。例如，组织样本为了保持其形态，可将其悬浮于特定物质中以便达到最佳效果，例如悬浮于最佳切割温度（OCT）复合物中进行冻存。组织样本通常按块冻存，但在冻存管中与OCT联合冻存，可提高小组织样本的可操作性⁶。

生物材料准备

生物材料冻存前进行的准备工作可能会对冻存结果产生影响。对于非复制性材料，如组织，核酸和蛋白等，准备过程包括确认生物材料处于合适的溶液或冻存培养基中，此步骤的目的在于复苏时达到最大化的预期用途。然而，活细胞和微生物的稳定性及复苏活力受生长条件和冻存前准备工作的影响。

细胞冻存前需考虑多种因素，包括细胞类型、活力、生长条件、生理状态、数目以及细胞前处理等。当建立一个新分离株或细胞系的初次种子储备时，必须对培养物进行检测并消毒，确保微生物污染的最小化。每次准备工作后，以及每次准备新批次的培养物时，均要重复这个步骤。

微生物

生长于通气培养条件下的微生物细胞，特别是细菌和酵母，表现出比生长于非通气条件下的细胞更强的耐受冷却和冻存伤害的能力。T.Nei认为²，在通气培养条件下，细胞通透性更好，且开放条件下培养细胞在冷却过程中比非通气条件下培养的细胞失水更快。另外，针对微生物细胞，在对数生长期后期及稳定期早期获得的细胞表现出更强的冰冻耐受性。从生长后期和静态培养早期收集的微生物细胞比生长早期和生长晚期的细胞表现了更强的冰冻耐受性。

一般来讲，初始冻存的细胞数目越多，复苏率越高。对于大多数细菌和酵母而言，保证约 10^7 /ml的细胞数才能确保足够数量的细胞复苏⁷。由于这些细胞可便捷地从琼脂培养板或斜面上收集，如果需要大量的细胞，也可使细胞生长于液体培养基中通过离心收集，在任何一种情况下，细胞通常悬浮在包含冻存保护剂的新鲜培养基中。原生生物可以通过离心浓缩，但通常需要悬浮于使用的培养基中，之后使用等体积含冻存保护剂的新鲜培养基稀释。

针对芽孢菌冻存，需要收集芽孢并重悬于含冻存保护剂的新鲜培养基中。冻存前，必须缩短操作时间且确保芽孢并未萌发。针对非芽孢菌冻存，冻存前需采用特殊程序收集菌丝体。某些坚硬菌丝体的真菌，需将含有菌丝体的琼脂块从培养基中切出，并将其置于含冻存保护剂的新鲜培养基中。坚硬菌丝体无法与琼脂培养基很好粘附，生长于肉汤培养基中时，冻存前需将菌丝体团进行混合⁷。

冻存材料的活力和复苏率由冻存前后的培养和生长状态决定。活力是衡量培养物生长和繁殖的一项指标。例如原生生物材

料等某些材料，需经过多次传代才能保证其稳定性。复苏细胞数量的估算有多种方法，包括连续稀释，平板计数或直接细胞计数。通过对比冻存前和复苏后细胞数量的差异，可说明细胞复苏程度或冻存过程是否成功。

哺乳动物细胞

哺乳动物细胞准备冻存时，需要将细胞调整到合适生长状态，确保既能得到足够的复苏细胞又无大量非必需生长的细胞。对大部分哺乳动物细胞来说，最优起始细胞数为 10^6 - 10^7 /ml 左右。为方便加入等体积的冻存保护剂（2×冻存保护剂+培养基），细胞悬液浓度应以起始浓度的两倍准备。或者，也可将沉淀细胞重悬在冻存保护剂（1×冻存保护剂+培养基）中达到预期细胞数。细胞操作应该温和小心，确保细胞在冻存前是健康的。尽量避免剧烈吹打及高速离心。适当情况下，可注入 5% 或 10%CO₂ 来调节 pH。

影响哺乳动物细胞复苏的因素包括：（a）细胞类型，（b）生长阶段，（c）细胞处于细胞周期的哪个阶段，（d）终悬液中的细胞数量和浓度。可通过优化以上因素来提高复苏细胞活力，另外，还需考虑冻存保护剂的特性以及冻存过程的具体操作。

哺乳动物细胞培养对其他细胞和微生物的污染特别敏感，例如 Hela 细胞⁸。由于这种特性，初始细胞系可通过同工酶分析、染色体组型分析、免疫分析或基因组分析，检测来源。冻存前后均应该进行如上检测。特别需要注意的是，病毒和支原体污染⁹。一套完整健全的哺乳动物细胞系鉴定程序应该包括，检查是否存在细菌、真菌、病毒、支原体、甚至原生生物细胞的污染。

干细胞

干细胞的冻存方式与哺乳动物细胞大体类似，除了部分提高复苏和克隆生长活性的步骤。一般使用 DMSO 为冻存保护剂，有时配合使用血清，推荐缓慢降温方式冻存。海藻糖与其它冻存保护剂联合使用，降低对细胞的潜在伤害¹⁰。同时，推荐快速升温方式复苏。复苏的细胞活力依据细胞类型不同可能呈现不同水平。

玻璃化（Vitrification）也可被用于冻存干细胞。操作流程包括，悬浮细胞于包含多种冻存保护剂的浓缩混合物中。另外，需要降温冻存和复苏过程的操作均十分快速，避免冰晶的形成。一些研究证明，玻璃化可得到更高的细胞活力¹¹。DMSO，甘油和丙二醇为常用的有效冻存干细胞的保护剂。

植物细胞

植物细胞冻存与其它细胞相似¹²。细胞的生长阶段会影响复苏效果，最适合的生长阶段为对数生长期后期。另外，细胞密度也大大影响复苏效果，最合适细胞密度取决于细胞类型。

联合使用冻存保护剂大多数情况下比单一使用效果更好。降温速率很重要，在很多情况下，两步降温法效果显著，即先将细胞在 -30℃ --40℃ 冻存一段时间再降温到液氮温度。这种方法增强了冻存前的胞质失水。通常推荐快速回温方式复苏，但是在某些情况下缓慢回温方式复苏效果更好。通过使用浓缩细胞悬液和快速降温，植物细胞也可使用玻璃化方式冻存。

植物的抗逆性培养使得其对于压力环境有更强的耐受性，例

如冻存过程。植物可产生一定数量的化合物，例如糖类或甘油，保护细胞减少渗透压改变造成的伤害。未分化愈伤组织冻存通常是为了获得稳定性状，这些性状会被持续培养所影响。

种子保存也是一种保存稳定植物种质（germplasm）的方法，最普遍的方法为保存于低湿低温处。然而，有些种子可耐受由冻存引发的失水，这样的种子便可冻存于液氮温度中。

病毒

大多数病毒可以无准备阶段直接冻存，且无需进行降温控制⁷。但是，与寄主细胞同培养的病毒，在冻存过程中需要进行降温控制。就寄宿细胞的病毒而言，应采取适当的冻存操作以保证宿主细胞的活力。当从卵细胞中获得病毒时，尿囊液或卵黄囊中的高蛋白物质可在冻存过程中对其提供保护。

植物病毒的保存既可以通过感染植物组织的方式，也可以是纯病毒制剂形式。病毒准备是在冻存前将其悬浮于 DMSO 或其它冻存保护剂中。虽然绝大部分植物病毒可耐受快速降温，但适当控制降温速率，可得到最好的复苏效果。直接在温水浴中浸泡便可对植物病毒进行复苏，之后将复苏病毒接种于合适植物寄主即可。

胚胎

胚胎可通过控制降温速率和玻璃化两种方式进行保存。复苏取决于胚胎发育的阶段，通过成功植入并进入胎儿发育来衡量复苏效果。

基因修饰材料

基因修饰过的细胞或组织的冻存操作同未修饰寄主细胞大体相同^{13,14}。

非复制性材料

非复制性材料，例如全血、血清、组织、核酸和蛋白质，对于材料的冻存并无特殊要求。这些材料一般直接冻存，不加冻存保护剂，且采用快速降温。然而，对于这些材料的实际冻存操作方式的选择取决于材料最终的使用目的。要在复苏后成功保留全血的特性，需要冻存保护剂和降温控制，而冻存组织的质量提高可以通过使用最佳切割温度（OCT）复合物材料等物质进行悬浮。

Quick-Reference Chart			
(To be used as a general guide only)			
Cell Type	No. of Cells	Cryoprotective Agent	Temperature
Bacteria	10 ⁷ /mL	Glycerol (10%)	-60°C*
Bacteriophage	10 ⁸ pfu/mL	Glycerol (10%)	-80°C
Fungi			
Hyphae	—†	Glycerol (10%)	-150°C
Spores	10 ⁶ /mL	Glycerol (10%)	-80°C
Yeast	10 ⁷ /mL	Glycerol (10%)	-150°C
Protozoa	10 ⁵ -10 ⁷ /mL	DMSO (5-10%) or Glycerol (10-20%)	-150°C
Algae	10 ⁵ -10 ⁷ /mL	Methanol (5-10%) or DMSO (5-10%)	-150°C
Plant Cells	—**	DMSO (5-10%) + Glycerol (5-10%)	-150°C
Animal Cells	10 ⁶ -10 ⁷ /mL	DMSO (5-10%) or Glycerol (5-10%)	-150°C
Hybridomas	10 ⁷ /mL	DMSO (5-10%) + Serum (20%)	-150°C
Stem Cells	10 ⁵ -10 ⁶ /mL	DMSO (5-10%) + Serum (20-90%)	-150°C
Sub/Non Cellular Materials			
Plant viruses	—‡	None	-80°C
Animal viruses			
Cell Free	—‡	None	-80°C
Infected Cells	10 ⁶ /mL	DMSO (7%) + Fetal Bovine Serum (10%)	-150°C
Plasmids	10 ⁶ /mL	Glycerol (10%)	-150°C
Phage Libraries	‡	Glycerol (10%)	-150°C
DNA	◊	None	-80°C
RNA	◊	None	-80°C
Protein	◊	None	-80°C
Serum	◊	None	-80°C
Multicellular			
Embryos	20	1,2-propanediol, glycerol or ethylene glycol	-150°C
Tissues	◊	OCT	-80°C
Blood	◊	Glycerol	-150°C ^{◊◊}

Quick-Reference Chart 注释:

- * 虽然对于表中标注的部分组织，-60°C 适宜长时间储存，但某些敏感细胞在此温度长时间储存后无法存活。
- † 不考虑细胞数量，真菌菌丝冻存通过准备菌丝体团。
- ** 植物细胞通常将细胞体积减少为 3-20%，以便冻存。
- ++ 感染颗粒的多少对病毒和细菌复苏效果影响不大。
- ◊ 非复制性材料浓度并不影响材料冻存，除非一些有特殊目的的具体应用。
- ◊◊ 全血和大部分成分血可以储存于 -80°C，但是淋巴细胞必须保存于 -150°C，以便之后建立细胞系使用。

平衡

冻存保护剂和细胞悬液混合后到开始降温前这段时间叫平衡期。对于大多数细胞，平衡期至少 15 分钟，但不超过 45-60 分钟。如果平衡时间过长，冻存保护剂可能会对细胞产生毒性。对于悬浮于 OTC 复合物中的组织，平衡期通常并不重要，因为 OCT 一般不会渗入组织，而只是在冻存和随后组织切片时提供支持。

平衡需要在室温下进行，它使冻存保护剂有时间渗入细胞，体积大、通透性低的细胞和胚胎需要更长的平衡期。在平衡期内，可以将细胞悬液分装到冻存管中，并进行其他的冻存准备工作。最优的平衡时间应根据经验确定，达到冻存后的细胞复苏效率最大化。

安瓿瓶和冻存管

某些小容量容器可以用于超低温储存细胞，如火焰密封的玻璃安瓿瓶和螺旋盖塑料冻存管。最常用的规格是 1.2-2.0ml 冻存管，此规格能使储存容量最大化，并使储存和检索操作轻松便捷。一般而言，可在每个容器中储存 0.5-1.0ml 的细胞悬液。选择容器时，需要考虑许多因素，包括冻存耐受性、存储条件、保存细胞类型、安全性等。

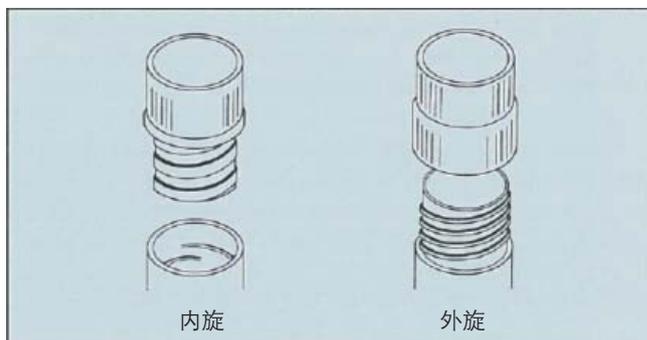


图 4: 内旋与外旋冻存管设计的对比

由于 -100°C 以上的低温中，低温机械应力不是太强，很多容器都可以使用。但是，当材料储存于液氮温度中时，必须使用特殊设计的能耐受液氮温度的容器。目前市场上有许多专为冻存设计的容器。塑料冻存管的螺旋口分为内螺旋和外螺旋（图 4）。容器类型可能影响升温的速度，因为塑料冻存管通常比玻璃安瓿瓶需要更长的升温时间才可达到完全解冻。升温速度的差异，可能会对一些较难培养细胞的活力产生影响，但对大多数细胞的活力是没有影响的。

其它可用于储存冻存材料的容器，包括传统上用来保存胚胎的麦管，以及通常用来冻存细胞芯片或克隆的微量滴定板。容器的选择，应该使得储存、检索和操作过程中材料维持活性的能力最大化。玻璃安瓿瓶可以用火焰密封，但是必须注意要正确密封，因为密封不当的玻璃安瓿瓶可能会有微小缝隙¹⁵，导致液氮随着时间的推移逐渐渗入。当安瓿瓶从液氮温度到室温进行操作时，安瓿瓶内液氮从液态到气态的快速转变会导致安瓿瓶的爆炸。带螺旋盖的塑料冻存管也易于液氮渗入¹⁶，并且在升温和操作过程中，当爆炸的可能性被最小化，液氮会从管盖或管身的间隙逃逸，也可能使冻存管内容物损失。

不推荐将储存管浸入液氮液相中储存。

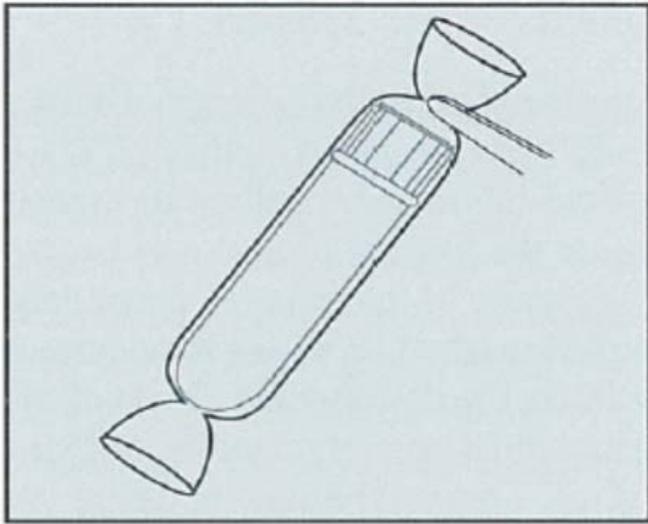


图 5: 如果塑料冻存管储存于液氮液相中, 强烈推荐使用 NUNC™ CryoFlex™ (NUNC 货号: 343958)。请看第 9 页的警告。

降温速率

一旦将细胞与冻存保护剂混合并置于冻存管后, 下一步就是降温。降温速度很重要, 因为它会影响冰晶形成的速度和大小, 以及冻存过程中的溶液效应。不同类型的细胞需要不同的降温速度, 但是对于大多数细胞和组织, 有效的降温速度是每分钟均一地降低 1°C。

一般而言, 细胞体积越大, 降温速度就越低。大多数细菌和产孢真菌能耐受低于理想值的降温速度, 且能在 -80°C 保存一段时间。更挑剔的细菌和无孢子的真菌则需要更均一的降温速度。原生生物、哺乳动物细胞和植物细胞通常需要控制更严格的降温速度, 包括采取一些特殊的操作, 以使降温导致的不利影响降至最低, 并减少由水变成冰的过程中所释放的热量。

COOLING RATES

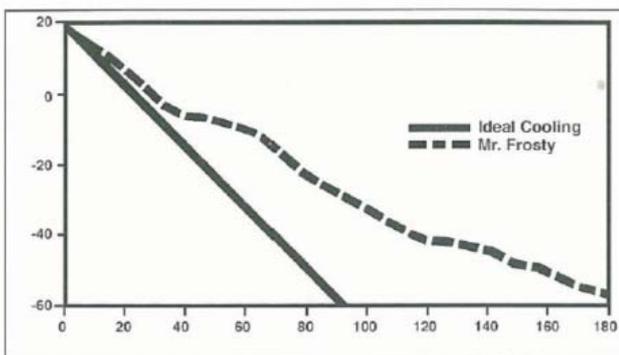


图 6: 理想的细胞降温速度, 以及由 NALGENE “Mr. Frosty” 梯度降温盒所提供的降温速度, NALGENE 货号: 5100-0001。

尽管对细胞降温过程中进行了控制, 但绝大部分水仍然会在 -2°C 至 -5°C 时结冰。由液态向结晶态的转变, 会导致能量以热的形式释放, 这就是通常所说的熔化潜热。在平衡冰点温度到达前, 样品会一直放热, 冰晶不断形成。为了让这个现象的不利影响降至最低, 降温过程必须通过人工诱导冰晶形成。人工诱导能够通过向悬浮液中加入冰晶或成核剂, 或者快速降低外环境温度以促使冰晶形成来实现。

为实现均一、可控的降温速度, 可使用程序化的细胞冻存装置。简单的装置, 只需在整个温度范围内选择单一的降温速度。然而, 更复杂的装置, 则可以在降温曲线的不同部分, 选择不同的降温速度。为模拟可控速度的降温过程, 更加低成本且易操作的方法是将冻存管置于 -60°C 至 -80°C 的机械冰箱。为获得均一的降温速度, 冻存管必须放置于特殊设计的容器内。

NALGENE “Mr. Frosty” 冻存容器 (货号: 5100-0001) 就是这样一个操作简易的装置, 它可以以每分钟非常接近 1°C 的速度进行降温 (图 6)。自制降温系统的降温速度是非可控的, 虽然平均每分钟降低 1°C, 但是从降温曲线上可以发现细胞在某个时刻会有更高的降温速度¹⁶。而且, 自制降温系统是不可重复的。“Mr. Frosty” 不需要进行酒精浴, 从而避免了酒精通过毛细作用渗透或残留在冻存管外壁而引起的污染。在低温处理过程中, 冻存管外残留的酒精会降低冻存管的表面温度不利于手握, 而且易滑。

由于胚胎的多细胞结构, 胚胎的冻存保存需要更加严格地控制降温过程。除了一般用于单细胞的控速降温之外, 玻璃化过程也被用于保存胚胎¹⁷。这就需要将胚胎悬浮于高黏度的溶液中, 并将悬浮液迅速降温以消除冰晶的形成。冻存形成的玻璃状小块需要贮存在液氮温度的环境中。如果贮存温度上升到 -130°C 以上, 冰晶就会形成, 导致胚胎损伤。



NALGENE “Mr. Frosty”

样品储存

样品冻存 48 小时后, 应该拿出一支冻存管解冻, 以检查细胞是否有活力, 是否可以建立细胞群 (即检查冻存步骤后细胞是否存活)。

查看复苏率鉴定, 请看后文。

冻存样品储存温度的高低, 会影响样品复苏前储存时间的长短。储存温度越低, 储存期越长。只有保存于 -130°C 之下, 冻存样品的稳定性才能得到保障¹⁸。一些细菌和产孢真菌可以在一段时间内耐受 -60°C 至 -80°C 的温度。但是, 更难培养的细胞, 如哺乳动物细胞、杂交瘤细胞、干细胞, 就必须储存于 -130°C 之下。如今已

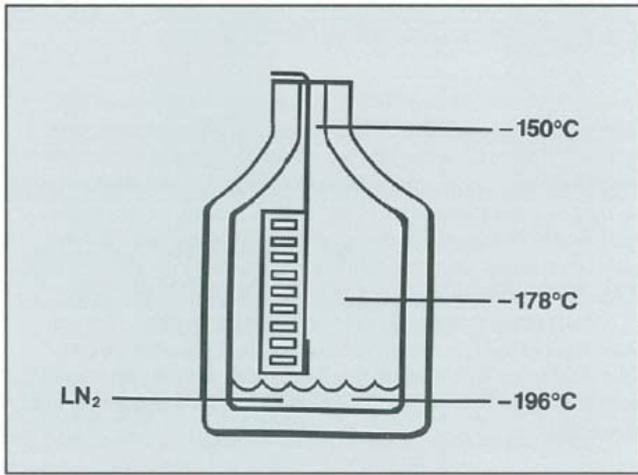


图 7：液氮储存系统的温度介绍。

证实，一些细胞在 -80°C 的储存条件下存活时间短于一年¹。

为了基本的安全和最大限度的稳定，活细胞和胚胎应该储存在液氮罐/箱中。然而，如前所述，将冻存管直接浸入液氮液相存在风险。只有装置开口处的工作温度保持在 -130°C 以下，液氮装置所提供的全气相环境才是理想的储存环境。

为了保证液氮冰箱内维持适当的工作温度，装置内液氮体积应该调整至当移开装置盖子时，储存材料上方的温度为 -150°C ¹⁹（图 7）。大多数液氮冰箱可以达到适当的工作温度，但是，一些设计模型需要较多的液氮才能达到适当的工作温度，从而减少了可用的存储空间。如果冻存管需要浸入液氮液相，必须将它们正确封装在 Nunc™ CryoFlex™ 冻存管套中，以防止液氮的渗入。使用不当可能会使液氮渗入冻存管，导致压强增大，进而可能发生爆炸和生物危害性样品的泄漏。对于未受到 Cryoflex™ 冻存管套妥善保护的浸入样品，渗入的液氮液相也可能成为其污染源。在大多时候， -130°C 的气相储存是合适的，可避免液相储存的危害。冷却至 -150°C 的机械冰箱也可以使用。

在冻存温度下，对保存材料不恰当的处理会对冻存细胞的活力产生不利影响。每一次将冻存管暴露于温度较高的环境，即使暴露时间很短，它还是经历了一次剧烈的温度变化。冻存系统的设计应该避免保存材料暴露于较高温度中，同时要使样品检索过程中人为使之暴露的时间最小化。当在较低温度检索盒子时，冻存盒堆叠放置方式（如不锈钢架）的顶端就必须暴露于温度较高的地方。当冻存盒堆叠放置时，在顶端的盒子里存放少数冻存管，而将其余的冻存管保存在位置较低的盒子里。这样，检索一支冻存管就无需暴露所有特殊培养或批次的冻存管。

为使液氮罐/箱的可用空间最大化，并使检索时材料暴露的时间最短，可以使用较小的冻存盒或铝条。将冻存管插到铝条中，每根铝条不要放超过一个批次的样品。铝条提供平坦的表面可以用来编码它们所在的位置，并在检索中易于鉴定。将铝条放置于纸板或塑料套中，以免冻存管从铝条中脱落（图 8）。当需要从铝条中检索冻存管时，提起铝条至暴露第一支冻存管的位置即可，无需移动处于工作温度中的其余冻存管。

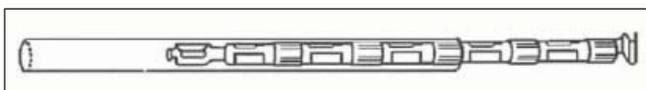


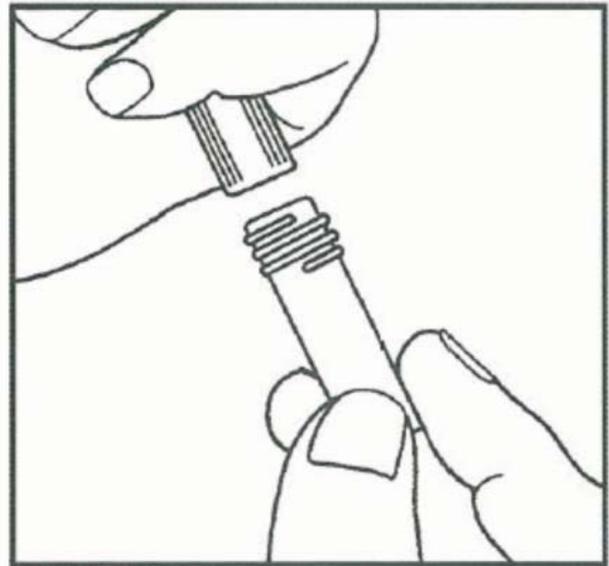
图 8：透明的塑料管套便于铝条中冻存管的观察。

复苏（解冻）

对于大多数细胞，都需要尽可能快地从冻存状态完全解冻。为了快速解冻，可将冻存管置于 37°C 的水浴中。记住，塑料管中的冻存细胞比玻璃安瓿瓶中的需要更长的时间解冻，并且，在升温过程中不时轻微地摇动会加快解冻过程。但是，值得注意的是，如果是原生物或哺乳动物细胞等较为脆弱的细胞，请不要剧烈地摇动冻存管。当冻存管内容物完全解冻时，请马上将其从水浴中移走。为使解冻过程导致污染的风险最小化，在打开管盖前，用酒精浸泡过的纱布对冻存管的表面进行消毒。

解冻后需要快速地将冻存管内容物转移到新鲜的生长培养基中，以使细胞最小程度地暴露在冻存保护剂中。大多数情况下，冻存管的所有内容物都要置于新鲜的培养基中，但对于细胞株而言，进一步的稀释是必要的。建议在首次稀释后将细胞悬浮液以 $100 \times g$ 离心 10 分钟，除去上清液，然后再次重悬细胞到新鲜的生长培养基中，以便去除残余的冻存保护剂。

有些对低温保存过程不敏感的材料可以耐受解冻和再冻存。大多数可复制的细胞不能忍受再冻存，除非它们处在抗性状态，如芽孢。然而对于非复制性材料，如血清、核酸和蛋白质，解冻和再冻存是可行的。记住，一份材料每解冻和再冻存一次，它们的特性就可能会有微小变化，影响到以后的使用。一个关于此问题的可选方案是将储存材料分成更小的份量来储存，每份仅用一次。



无菌技术使污染的可能性最小化

若需更多低温贮藏和冻存产品的相关信息，请访问我们的网站：www.nalgene.com & www.nuncbrand.com

复苏率鉴定

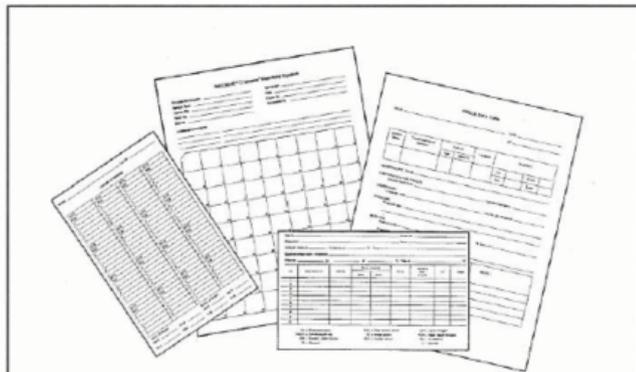
用于估计冻存后复苏的活细胞数量的方法，主要是根据保存材料的类型来决定。仅靠目测计数具有欺骗性，虽然染色法和染料排斥法能有效地指示大多数哺乳动物的活细胞的状况，但是它们都不能再用于建立细胞群。对于微生物细胞，连续稀释法和平板计数法对复苏细胞群的计数都有效。虽然同一批次可能会有管和管之间的差异，但由于不变的保存条件，所有冻存管中复苏细胞的数量一般是相同的。管与管之间的差异意味着在保存和操作过程中出现的问题。

对于干细胞，复苏细胞的计数方法和其它哺乳动物细胞一样，通过估算活细胞数量来测定。此外，测量它们的分化能力和克隆形成能力在确定干细胞的完全复苏时也很重要。胚胎复苏可以通过形态检查来确定，通过胚胎植入和胎儿发育来验证。非复制性材料通过它们预期用途的结果来检测复苏状况。

在库控制

保持适当的记录对所有实验室都很重要，对于保持冻存材料的记录，可以采用很多方法²⁰。一旦建立起您自己的方法，这些主要信息在将来会是十分重要的：(a)使用的保存方法(b)保存材料的位置及标识(c)储存日期以及(d)可复制材料的传代数。这些项目编号应该与保存材料的相关数据联系起来，并且每个容器都需要一个特定的识别码，它与这一部分材料的信息相关。

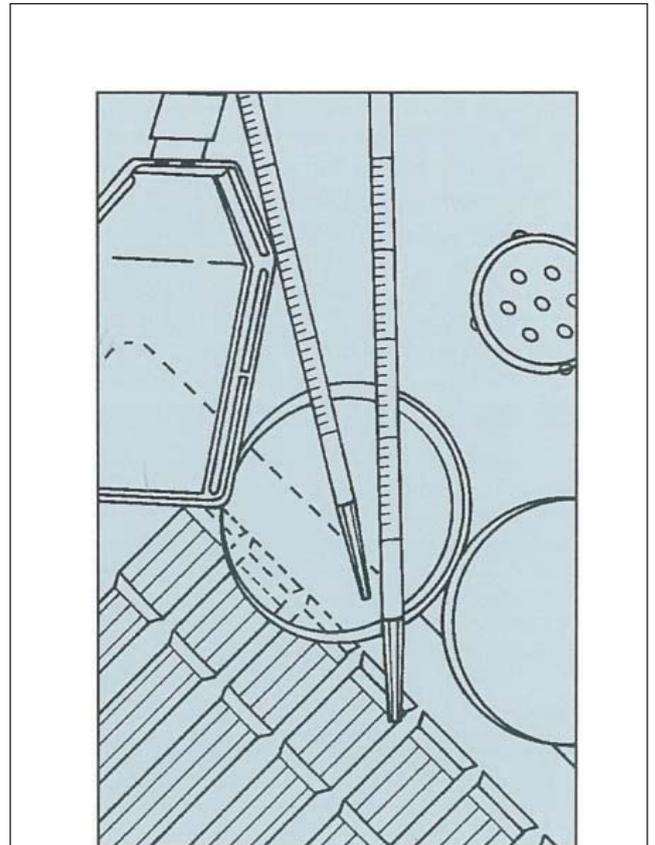
标识首先要贴在储存容器上贴上适当的标签。标签上的信息应该包括冻存材料的名字或识别码，以及批号。标签上的信息应该储存于库存记录中，包括每支冻存管位置编码。这些记录可以是以纸质文件保存，或是更好的选择——电子文件。库存记录的复制版要和工作记录分开保存。定位编码要有足够的特异性，以便快速而简易地检索到特定的批号，并且应该包括冰箱单元编码(即冰箱区域或库存架的编码)，冻存盒或冻存管编码，甚至是一个冻存盒里的格子位置或使用冻存铝条时的冻存铝条编号。详细的定位编码可以使寻找材料的时间最小化，从而降低设备升温的风险，避免其它材料暴露于较高的温度中，同时缩短实验室工作人员处于极冷环境中的时间。



为冻存材料保持精确的记录。在本手册最后附有完整的记录表格，并可复制使用。

生物材料管理实践

尽管低温保存用于稳定活性材料，但是它会对细胞产生压力。操作必须很小心，确保在保存过程中这些材料能够维持原样。一个好的保存项目应该包括有效的特征描述和目录表，这两者合二为一提供了生物材料采集的最佳实践。对于价值低、特异性不高、被污染或无法识别的保存材料，通常很少使用。保持生物材料采集的第一步，就是要确保这些材料能使用，并且有保存的价值。这个原则要贯穿于材料采集的全过程，以便于最大程度地降低保存材料的累积，避免造成难以管理的局面。为了避免采集材料的重复，需要建立一套鉴定每个项目的体系。这可以通过设计独一无二的数字系统，或是数字和字母的组合系统来实现。每一个鉴定数字都要和生物材料的其他信息相一致。活细胞的保存能够保证稳定性，但不能改善材料已出现的问题²⁰。任何材料在保存之前都需要经过彻底的检查，检查是否被污染，是否有适当的鉴定和其他该细胞独有的特征。由于冻存会对细胞产生压力，并且操作过程有使细胞污染的风险，所以在细胞成功保存后，特征描述也必须持续地记录。每一批新的冻存材料准备好后，都应当对其进行完全的特征描述。在所有生物材料采集过程中，建立目录并且做好数据记录十分重要。目录可以确保保存材料不会重复，并且当其他人需要使用时，这些目录尤其有用。对采集材料保持特征描述和保存的数据记录，能够确保在未来遇到问题时准确地找到材料的保存位置。优秀的生物材料管理具有一个重要的方面，即能够不断地对材料有用性进行评估，并且清除不再需要的材料。



您能采用多种测验来正确鉴定细胞系。正确的鉴定对于防止交叉污染十分重要。

安全注意事项

在储存和保持的过程中，必须严格遵守安全预防措施。任何具有危险性的工作都要在恰当的防范下进行，时刻遵守美国公共卫生服务生物安全等级指南²¹。

人类和其他灵长类细胞可能含有需特殊处理的外来病毒性病原，所有尚未经过完全特征描述的灵长类动物细胞，都要在二级生物安全实验室中进行操作。在此级别，实验室成员必须经过致病性病原操作的培训，并且要在专业人员的指导下工作。严禁闲杂人员进入实验室，并且当有大规模工作或有气雾等产生时，必须使用生物安全柜²¹。

低温储存有一定的危险，因此必须采取安全预防措施。冻存温度会导致实验人员处于极冷的环境中，所以在操作液氮罐/箱时，必须要采取防范措施来保护实验人员。隔热手套，长袖实验服或者其他装备，能够用于保护皮肤不暴露。当在液氮罐/箱的液体部分工作时，戴好面部和颈部的防护罩十分重要。如前文所述，将安瓿瓶从液氮中取出进行检索时，未正确密封的玻璃安瓿瓶可能会爆炸。为了使爆炸的风险降至最低，可以将安瓿瓶放在同一个液氮罐/箱的气态氮中，至少放置 24 小时后取出。在从液氮中取出安瓿瓶进行检索时，必须要戴能保护颈部的面罩。强烈推荐使用 NUNC™ CryoFlex™。请阅读本页警示。

在液氮温度下操作危险性生物材料时，需要采取特别的防范措施。解冻和打开装有危险性材料的冻存管，必须在生物安全柜中进行。做好安瓿瓶或冻存管爆炸和渗漏的准备。液氮冰箱中损坏的安瓿瓶是潜在的污染源，而且尽管温度极低，污染物仍能存活²²。一旦液氮罐/箱被污染，整个设备单元都应当在升温至室温后去污。当停用一个没有被明显污染的液氮罐/箱时，要将其中储存的材料全部移开，让设备单元恢复到室温并对其消毒，以待进一步操作。

细胞培养操作步骤（非干细胞）

1. 获得对数生长晚期或稳定生长早期的细胞。如果细胞粘附于培养表面生长，需将它们刮下。如果需要，将液体培养基或不依赖于支持物生长的细胞离心，以获得所需的细胞团。
2. 为新配制的生长培养基准备好一定浓度的已灭菌的 DMSO 或甘油。当与悬浮细胞混合后，准备好浓度为终浓度两倍的冻存保护剂。
3. 将冻存保护溶液加至细胞团中，或将溶液与悬浮细胞混合。开始记录平衡期的时间。
4. 轻轻地将细胞悬液分装到冻存管中。
5. 待适当的平衡时间后，开始冷却细胞。
 - A. 无控制冷却：将冻存管置于 -60° 冰箱的底部 90 分钟。
 - B. 半控制冷却：使用 Mr. Frosty 冻存容器，在 -70° 冰箱中冻存冻存管。
 - C. 可控制冷却：使用程序化的冷却装置，以每分钟降低 1°C 的速率将细胞冷却至 -40°C。
6. 将细胞从冷却装置中取出，放置于合适的储存温度下。
7. 样品复苏时，可将冻存管取出，置于 37° 水浴中。当完全解冻后，温和地将所有内容物转移到新鲜的生长培养基中。

警告：

除非已提前密封在 NUNC™ CryoFlex™ 冻存管套 (货号：343958) 中，否则冻存管不能直接放入液氮液相储存。因为如果这样操作，有可能使液态氮滞留管内并造成压力积聚，最终可能会引起爆炸或生物危害释放。处理和丢弃冻存管时，请按照手册所述的安全步骤进行操作。

精选文献参考

1. Simione, F.P. 1992. Key issues relating to the genetic stability and preservation of cells and cell banks. *J. Parent. Science and Technology* 46: 226-232.
2. Nei, T., T. Araki and T. Matsusaka. 1969. Freezing injury to aerated and non-aerated cultures of *Escherichia coli*. In T. Nei, Ed. *Freezing and Drying of Microorganisms*. University of Tokyo Press, Tokyo, Japan.
3. Mazur, P., S.P. Leibo and E.H.Y. Chu. 1972. A two factor hypothesis of freezing injury. *Experimental Cell Research* 71:345-355.
4. Baust, J.M. 2002. Molecular mechanisms of cellular demise associated with cryopreservation failure. *Cell Preservation Technology* 1:17-31.
5. Baust, J.M., R. Van Buskirk, and J.G. Baust. 2002. Gene activation of the apoptotic caspase cascade following cryogenic storage. *Cell Preservation Technology* 1:63-80.
6. Loken, S.D. and D. J. Demetrick. 2005. A novel method for freezing and storing research tissue bank specimens. *Human Pathology* 36:977-980.
7. Ed. F.P. Simione and E.M. Brown. 1991. *ATCC Preservation Methods: Freezing and Freeze Drying*. American Type Culture Collection, Rockville, Maryland.
8. Lavappa, K.S. 1978. Survey of ATCC stocks of human cell lines for HeLa contamination. *In Vitro* 14: 469-475.
9. McGarrity, G.J. 1982. Detection of mycoplasmal infection of cell cultures. *Adv. Cell Culture* 2: 99-131.
10. Buchanan, S.S., M.A. Menze, S.C. Hand, D.W. Pyatt and J.F. Carpenter. 2005. Cryopreservation of human hematopoietic stem and progenitor cells loaded with trehalose: transient permeabilization via the adenosine triphosphate-dependent P2Z receptor channel. *Cell Preservation Technology* 3:212-222.
11. Fujioka, T., Y. K. Yasuchika, Y. Nakamura, N. Nakatsuji, and H. Suemori. 2004. A simple and efficient cryopreservation method for primate embryonic stem cells. *Int. J. Dev. Biol.* 48:1149-1154.
12. Withers, L.A. 1985. Cryopreservation of cultured plant cells and protoplasts. In: K.K.Kartha, Ed. *Cryopreservation of Plant Cells and Organs*, CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida.
13. Nierman, W.C. and T.Feldblyum. 1985. Cryopreservation of cultures that contain plasmids. *Dev. Ind. Microbiol.* 26:423-434.
14. Nierman, W.C., C.Trypus and L.L. Deaven. 1987. Preservation and stability of bacteriophage lambda libraries by freezing in liquid nitrogen. *Biotechniques* 5:724-727.
15. Greiff, D., H. Melton and T.W.Rowe. 1975. On the sealing of gasfilled glass ampoules. *Cryobiology* 12:1-14.
16. Simione, F.P., P.M. Daggett, M.S. MacGrath and M.T. Alexander. 1977. The use of plastic ampoules for freeze preservation of microorganisms. *Cryobiology* 14:500-502.
17. Rall, W.F. 1987. Factors affecting the survival of mouse embryos cryopreserved by vitrification. *Cryobiology* 24:387-402.
18. Mazur, P. 1984. Freezing of living cells: mechanisms and implications. *Am J. Physiol.* 247:125-142.
19. Simione, F.P. and J.Z. Karpinsky. Points to Consider Before Validating a Liquid Nitrogen Freezer, In: *Validation Practices for Biotechnology Products*, ASTM STP 1260, J.K. Shillenn, Ed., American Society for Testing and Materials, 1996, pgs. 24-30.
20. Simione, F.P. Cryopreservation: Storage and Documentation Systems, In: *Biotechnology: Quality Assurance and Validation*, Drug Manufacturing Technology Series, Vol. 4, Interpharm Press, Buffalo Grove, Illinois, 1999, pgs. 7-31.
21. *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories.*, 4th Edition, U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Centers for Disease Control and NIH, Bethesda, Maryland, 1999.
22. Tedder, R.S., M.A. Zuckerman, A.H. Goldstone, A.E. Hawkins, A.Fielding, E.M. Briggs, D. Irwin, S. Blair, A.M. Gorman and K.G. Patterson. 1995. Hepatitis B transmission from contaminated cryopreservation tank. *Lancet* 346:137-140.

警告：

除非已提前密封在 NUNC™ CryoFlex™ 冻存管套 (货号: 343958) 中, 否则冻存管不能直接放入液氮液相储存, 因为如果这样操作, 有可能使液态氮滞留管内并造成压力积聚, 最终可能会引起爆炸或生物危害释放。处理和丢弃冻存管时, 请按照手册所述的安全步骤进行操作。

关于冻存和冻存产品的更多信息, 请访问我们的网站:
www.nalgene.com & www.nuncbrand.com

Cryoware Inventory System

Principal Investigator: _____

Technician: _____

Sample Type: _____

Date: _____

Freezer No.: _____

Frozen by: _____

Rack No.: _____

Recovered by: _____

Box No.: _____

Additional Comments

_____:

_____:

_____:

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
41	42	43	44	45	46	47	48	49	50
51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
61	62	63	64	65	66	67	68	69	70
71	72	73	74	75	76	77	78	79	80
81	82	83	84	85	86	87	88	89	90
91	92	93	94	95	96	97	98	99	100

FREEZE DATA FORM

NAME _____ DATE _____

Growth Temp.	Cryopreservative Solution	Culture		Location	Inventory			
		Age	Medium		Storage Temp.		Seed	
					Gas		Working Lot	

MICROSCOPIC EXAM _____

PREPARATION FOR FREEZE:

Equilibration time _____ Equilibration temp. _____

DISPENSING:

Vial type _____ Volume per vial _____

FREEZING:

Program rate _____

SURVIVAL:

Prefreeze count _____ cells/ml Total vol.frozen _____ ml % Viable _____

Postfreeze count _____ cells/ml Total vol.resuspended _____ ml

DATE	Survival			NOTES
	%Rec	Purity <small>(free from contaminants)</small>	No.pass	

COMMENTS

NAME _____

LIQUID NITROGEN STORAGE ON CANES

DATE:	DATE:	DATE:	DATE:
POS:	POS:	POS:	POS:
6	6	6	6
5	5	5	5
4	4	4	4
3	3	3	3
2	2	2	2
1	1	1	1
DATE:	DATE:	DATE:	DATE:
POS:	POS:	POS:	POS:
6	6	6	6
5	5	5	5
4	4	4	4
3	3	3	3
2	2	2	2
1	1	1	1
DATE:	DATE:	DATE:	DATE:
POS:	POS:	POS:	POS:
6	6	6	6
5	5	5	5
4	4	4	4
3	3	3	3
2	2	2	2
1	1	1	1
DATE:	DATE:	DATE:	DATE:
POS:	POS:	POS:	POS:
6	6	6	6
5	5	5	5
4	4	4	4
3	3	3	3
2	2	2	2
1	1	1	1

SAFE DEPOSIT: _____

DATE: _____ DATE: _____ DATE: _____ DATE: _____
 POS: _____ POS: _____ POS: _____ POS: _____

NAME _____ Strain _____

Growth: Medium _____ Temperature _____ °C Time _____

Special preservation conditions _____

Thaw at _____ °C

Lot	Date Preserved	Method	Stocks Prepared		Purity <small>(free from contaminants)</small>	Transfers from Original	Ch	Initials
			Seed	Order				
1								
2								
3								
4								
5								
6								
7								
8								
9								
10								

DMSO=Dimethylsulfoxide

DW=Distilled water (sterile)

G=Glycerol

S=Sucrose

No=No additive

FBS=Fetal bovine serum

HS=Horse serum

HuS=Human serum

LN₂=Liquid nitrogen

VLN₂=Vapor, liquid nitrogen

Ch=Characterization

警告

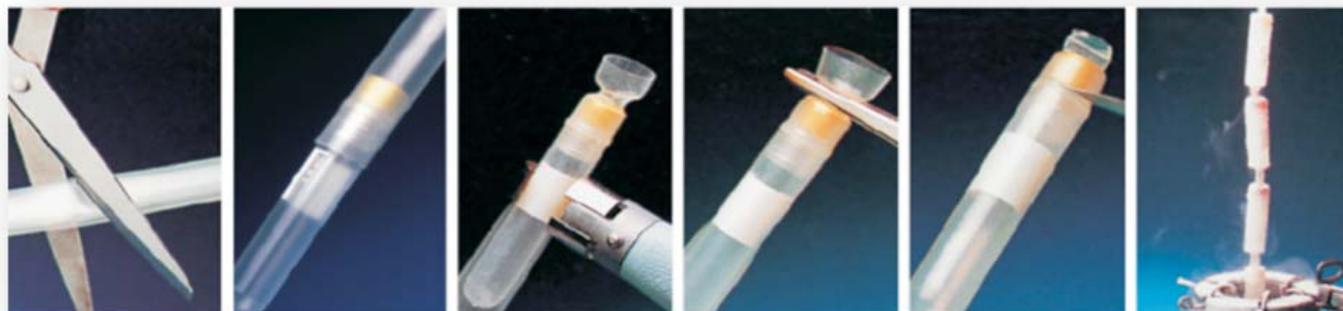
除非已提前密封在 NUNC™ CryoFlex™ 冻存管套 (货号: 343958) 中, 否则冻存管不能直接放入液氮液相储存。

不同材料的收缩速率不同, 在降温过程中难免会产生微小的缝隙, 此时可能会有少量液氮进入到冻存管内造成压力积聚。在“复苏”冻存样品时可能会引起爆炸或生物危害释放, 造成样品的损失和实验人员的伤害。处理和丢弃冻存管时, 请按照手册所述的安全步骤进行操作。



如果确实需要在液氮中放置保存, 建议一定要使用额外的保护措施。例如使用 Nunc CryoFlex™ 冻存管保护膜 (货号: 343958) 进行密封, 佩戴 Nalgene 防护面罩 (货号: 6355-0001) 等。

Nunc CryoFlex™ 冻存管保护膜使用指南:



订货信息:



Nunc CryoFlex™ 冻存管套			
产品编号	描述	材料	数量 每包 / 箱
343958	为生物危害性样品寄液氮储存提供额外的安全	聚乙烯	15/30

Nalgene 面罩订货信息:



Nalgene 面罩			
产品编号	描述	材料	数量 每包 / 箱
6355-0001	该可调节面罩拥有一个大小为 1/16 in. (1.5mm) 的聚碳酸酯透明窗口, 可提供冲撞防护。装有舒适的可调节头饰, 环绕式设计可提供对头部正面和侧面的保护。大小为长 × 宽为 29.5cm × 20cm, 该尺寸还可对颈部和头顶提供保护。用户可舒适地将其佩戴于护目镜外。符合 OSHA 标准 29 CFR 部分 1910.1030. 符合 ANSI 标准 Z87.1. 生物危害 / 透明	聚碳酸酯; 聚乙烯头饰	1/4



NALGENE® 和 NUNC™ 冻存产品包含您安全保存和管理冻存样品所需的所有产品。

若需更多 Nunc 或 Nalgene 冻存产品的推荐使用信息，请联系我们技术支持团队的免费电话：800-810-5118，或电子邮箱：info.nnichina@thermofisher.com。

即日通过电话获取 Nalgene & Nunc 组合冻存手册！
请拨打 1-866-686-2548 (USA)



赛默飞世尔科技（中国）有限公司

上海（中国总部）
上海浦东新金桥路27号7号楼

广州
广州东风中路410-412号
时代地产中心3001-3004

沈阳
沈阳市沈河区惠工街10号
卓越大厦3109室

北京
北京市安定门东大街28号
雍和大厦西楼7座7层

成都
成都市武侯区临江西路1号
锦江国际大厦1406

香港
香港新界沙田，沙田乡事会路138号
新城市中央广场第一座九楼11-15室

免费服务热线：300 810 5118 400 650 5118（支持手机用户）

Thermo Fisher
SCIENTIFIC