

文章编号:0253-4339(2019)06-0142-09
doi:10.3969/j.issn.0253-4339.2019.06.142

粪菌低温保存的研究进展

火晓越¹ 蒋沛¹ 刘宝林¹ 梁玮²

(1 上海理工大学生物系统热科学研究所 上海 200093)

2 上海交通大学医学院附属新华医院环境与儿童健康教育部和上海市重点实验室 上海 200092)

摘 要 肠道菌群在人类和动物的健康方面起着越来越重要的作用,而粪便样本的保存质量对研究结果有直接影响。本文归纳了粪菌保存的主要作用,介绍了低温保存的机制,总结粪菌的保存方法,包括冷冻保存、冷冻干燥保存、冷藏保存和其他非低温保存方式,表明在-80℃下冷冻的样本具有较稳定的 DNA 和微生物群落,提出添加有效的低温保护剂能阻止冰晶形成,提高粪菌活性。探讨了影响样本保存效果的主要因素,并对未来具有可行性的新方法进行展望。

关键词 低温保存;粪菌;肠道菌群;冷冻干燥

中图分类号:TQ028.6⁺3; R318.52 **文献标识码**:A

Fecal Bacteria Cryopreservation: A Review

Huo Xiaoyue¹ Jiang Pei¹ Liu Baolin¹ Liang Wei²

(1. Institute of Biothermal Science and Technology, University of Shanghai for Science and Technology, Shanghai, 200093, China; 2. Xin Hua Hospital Affiliated to Shanghai Jiaotong University School of Medicine, MOE-Shanghai Key Laboratory of Children's Environmental Health, Shanghai, 200092, China)

Abstract Gut microbiota plays an important role in the health of humans and animals. The preservation quality of the fecal samples has a direct impact on the results of study. This paper summarizes the main application of fecal bacteria preservation, introduces the mechanism of cryopreservation, and summarizes the preservation methods of fecal bacteria, including cryopreservation, freeze-drying preservation, refrigerated storage and other non-cryogenic preservation methods. This paper shows that the samples frozen at -80℃ have a relatively stable DNA and microbial communities. We propose that the addition of an effective cryoprotectant can prevent the formation of ice crystals and increase the activity of fecal bacteria. This review discusses the main factors affecting the preservation of fecal bacteria (such as sample storage temperature, time, species types, homogenization, etc.), and prospects some new feasible methods.

Keywords cryopreservation; fecal bacteria; gut microbes; lyophilization

近年来,宏基因组测序技术和生物信息学的发展使人类进一步认识了肠道菌群。肠道菌群对炎症^[1]、代谢性疾病^[2]、肥胖^[3]、精神障碍^[4]等疾病有重要影响,研究相关微生物组成和变化有助于预防、诊断并最终治愈多种疾病。粪便采集为肠道菌群的研究提供了一种非侵入性采样方法,广泛的用于宏基因组研究。过去 10 年,关于粪便微生物与人类健康的双向关系取得了很多研究成果^[5]。

粪菌移植和疾病科学研究的需求推动了粪菌库的建设。然而,粪便样本采集后,储存和运输的最佳条件仍然不明确。通常,粪便样本需要在-20℃或更低温度下冷冻储存,然后通过冷链转移到实验室。但是这种操作在偏远的野外地区或一些欠发达地区不

易实现,还可能大幅增加成本,于是人们开始研究干燥保存等其他方式,保存效果因物种、样本暴露的温度和时间等不同而变化^[6]。

本文阐述了低温保存微生物及细胞的相关机制,总结了粪菌保存的主要作用,回顾了关于粪菌采集和保存方法的研究成果,研究影响其保存效果的主要因素,并对未来粪菌保存的可行方法和研究方向进行展望,希望能有助于研究人员建立更合理的保存方案。

1 低温保存的机制

1.1 低温损伤

低温保存在活细胞和组织中的应用彻底改变了生物及医学领域。在生物和医学中,低温范围比较

广,可以从稍低于正常体温(37℃)直到-196℃。成功的低温保存需要在超低温下冷冻细胞,在冷冻过程中水转变为冰所带来的生物和物理变化是造成损害的主要原因,而并非低温本身。P. Mazur 等^[7]提出了冷冻损伤的“两因素假说”,即“溶液损伤”和“胞内冰损伤”。刘威等^[8]详细讨论了关于胞内冰形成的主要机制。这两类损伤不仅会造成细胞形态和功能的改变,还会使胞内生物大分子(如 DNA、RNA、蛋白质和脂类等)降解或突变,造成细胞的无效保存^[9]。

综合两方面的因素,必然存在最佳冷却速率,表征细胞的最佳存活率。冷冻保存技术可分为两类:程序法慢速冷冻和玻璃化保存,如图 1 所示。

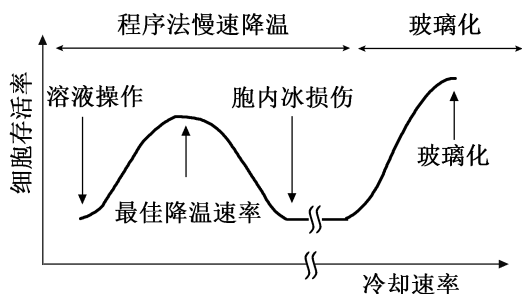


图 1 细胞存活率与冷却速率的关系

Fig.1 Relationship between cell viability and cooling rate

1.2 低温保护剂的作用机理

低温保存是生物样本长期保存的重要方法,而低温保护剂(cryoprotectant, CPA)可以保护细胞免受渗透损伤,维持细胞的正常结构和功能,并对生物大分子产生一定保护作用^[9]。S. Sariözkan 等^[10]将大鼠的精子冷藏保存在 4℃,发现棉子糖、海藻糖和果糖有助于保护精子的运动性、形态和 DNA 完整性。J. Botling 等^[11]认为 RNAlater 试剂能更有效地阻止冻存样本的 RNA 降解,保持生物大分子的完整性。

按保护剂是否能进入细胞内,可将其分为渗透型和非渗透型两种。常用的渗透型保护剂有甘油、乙二醇、二甲基亚砷、乙酰胺等。这类保护剂多属低分子物质,在溶液中易结合水分子,发生水合作用,增加溶液黏性,弱化水的结晶过程^[12]。保护剂可以替代胞外电解质渗透入细胞,当细胞外冻结时,能够减轻细胞皱缩程度,减小渗透肿胀,从而降低冻融对细胞的伤害^[13]。非渗透型保护剂包括糖类和一些大分子物质(葡聚糖、聚乙二醇、聚乙烯醇等)。这类物质能溶于水,但不能进入细胞。其加入到溶液后可使溶液呈过冷状态,抑制冰晶形成,降低特定温度下的电解质浓度,从而起到保护作用。

还有一些天然的保护剂,如冰成核剂(ice-nucleating agents, INA)和抗冻蛋白(anti-freeze proteins,

AFP)^[14]。冰成核剂可以控制冰的形成位置,在合适的位置适度促进冰的形成,耐冷性林蛙(*Rana sylvatica*)血浆中的蛋白质已被证明具有 INA 特性^[15]。AFP 能保证某些物种在零下温度的环境中生存。不像其他的保护剂,AFP 以非依数性的方式迟滞水溶液的冰点,而不影响其熔点,其活性取决于冰点和熔点的差值大小。AFP 能够抑制冰晶的生长是依靠一种吸附-抑制机制,可与特定表面的冰晶结合,从热力学和动力学角度而言,均不利于冰晶生长。AFP 还能维持细胞膜的稳定性,有助于抑制复温过程的重结晶。因此,在低温保存中将 AFP 结合其他保护剂一起使用意义重大。“阻冰”的概念启发人们寻找能够发挥这种功能的合成化合物,如 R. C. Deller 等^[16]发现聚乙烯醇有类似的作用,这类保护剂可能在未来具有更广泛的研究和应用价值。

2 粪菌的低温保存

2.1 粪菌低温保存的应用

2.1.1 临床应用——粪菌移植

粪菌移植(fecal microbiota transplantation, FMT)是将健康人的粪便处理为混悬液状态,以某种途径移植到患者胃肠道内,利用正常粪便中的功能菌群,在患者体内重建具有多样性的肠道菌群,对肠道及肠道外的疾病实现有效诊疗^[17]。近几年 FMT 已成为生物医学和临床医学的研究热点。

肠道菌群异常是导致各种肠道疾病的重要原因。严重的肠道细菌感染一般均使用抗生素治疗,但当所有可用的抗生素都无济于事时,粪菌移植可能是唯一的希望。FMT 成为医学突破,不是技术或理论的突破,而是认识的突破^[18]。FMT 治疗复发性艰难梭菌感染(*Clostridium difficile* infection, CDI)已被列入《临床诊疗指南》^[19]。最近一项研究显示, FMT 对于 CDI 的总体治愈率可达 92%^[20],其有效性和安全性在进一步研究中得到了证实^[21-22]。

许多研究揭示了 FMT 在治疗炎症性肠病^[23]、肠易激综合征^[24]、便秘^[25]、代谢综合征^[26]等疾病中的潜在治疗价值。

FMT 推荐使用新鲜粪菌液,但在临床应用中通常无法随时随地获得新鲜健康的样本,为了进行异地治疗或延长粪菌的有效期,有必要提前对其进行采集和保存。如何实现粪菌的有效储存,如今还面临较大的挑战^[27]。将粪菌冷冻于-80℃是常用的技术方法之一。Jiang Z. D. 等^[28]对患者进行相同供体的 FMT 时,发现新鲜菌液和冷冻菌液的有效性相似,而与新鲜样本相比,冻干样本的功效略低。因此,粪菌的保

存方法是影响 FMT 临床治疗效果的重要因素之一。

2.1.2 科学研究

保存的粪菌除了可用作临床治疗外,在人类生命健康的研究中也有重要作用。粪便样本广泛用于宏基因组研究,旨在阐明人类健康与肠道微生物群之间的关系^[29];在大规模流行病学研究中,用有效的手段保存粪便样本,进行微生物群落分析,从而展开前瞻性研究^[30];在非靶向性代谢组学分析中,粪便样本也有普遍的应用价值^[31]。

粪菌还可用于评估野生动物的健康,研究宿主和环境之间的相互作用。包括粪便类固醇激素分析^[32]、寄生虫检测^[33]和种群的遗传相关性^[34]等。但常见的保存方法(如-80℃下冷冻)不适用于野外采集。因此许多研究都在优化野生动物的粪便保存方案,表明新型保存方法的探索是未来的研究方向之一。

2.2 粪菌的低温保存方法

影响粪菌有效性的因素较多,如样本的收集、运输、均质化^[35]、保存和二次取样等。为了满足临床应用及科研需求,保持菌种的优良特性非常重要,这就需要长期保持菌种不发生变异,即菌种的形态、遗传特性、功能等不发生改变。在微生物的众多保存方法中,冷冻保存法和冷冻干燥保存法是公认的长期保存微生物菌种最安全、可靠的方法^[36]。粪菌的低温保存方法可分为 4 类:冷冻保存、冷冻干燥保存、冷藏保存、其他非低温保存。

2.2.1 冷冻保存

冷冻保存一般是将均质化后的等分粪便试样置于-196℃(液氮)、-80℃或-20℃的环境中进行保存。这种方法通常被视为微生物的“黄金保存法”^[37],因为低温可有效抑制微生物生长,并保持较高的 DNA 浓度。

液氮超低温保存法已成功应用于乳酸菌、酵母菌、微型藻类和原生动物等生物体的保存^[36]。乳酸菌是粪便样本中的主要菌群之一,其保存效果对样品的保存有直接影响。F. Fonseca 等^[38]首次研究了冷却速度和保存温度对乳酸菌活性的影响,发现以甘油作为保护剂,乳酸菌以任何冷却速率保存时,胞内均无冰晶形成,将其直接浸入液氮中获得的高冷却速率会使细胞活力的损失降到最低。因此液氮保存是一种有效的方法,但目前关于粪菌液氮保存的具体研究还较少。

冷冻保存粪菌样本的目的有两个:1)为了保存菌种的活性;2)保存样本中稳定的 DNA 或其他生物标志物。第一个目的可用于 FMT 以替代新鲜粪菌,

解决异地治疗的问题。Tang Guihua 等^[39]证明了在复发性或难治性 CDI 患者中,冷冻 FMT 与新鲜 FMT 一样有效。S. P. Costello 等^[40]研究发现,用于治疗复发性艰难梭菌感染的粪菌微生物可以安全地在 10% 甘油中冷冻储存至少 6 个月,而不会失去临床功效或活力,第一次 FMT 对于复发性艰难梭菌感染的治愈率为 88%,病症复发后的再次 FMT 治愈率为 100%。第二个目的用于各种科学研究。F. Foulhy 等^[41]将新鲜分离的粪菌在干冰上快速冷冻或在-80℃下冷冻 7 d,然后提取 DNA 并与新鲜样本对照,发现种群分布没有显著差异,快速冷冻的样本保持了微生物群落的完整性。

一些研究也将用于细胞的传统低温保护剂应用于粪菌的低温保存中,比较常用的是甘油。M. Aguirre 等^[42]将制备的人粪便样本重悬在含有甘油的保护剂中,然后在-80℃下储存,结果与新鲜粪便样本的细菌代谢活性和微生物群落分布高度一致,并建议将冷冻后的粪便物质作为新鲜粪便替代物用于体外发酵研究。K. R. Horng 等^[43]使用甘油与磷酸缓冲盐溶液保存样本,发现在-80℃保存时能够明显提高样本 DNA 浓度和香农多样性指数。F. M. Kerckhof 等^[44]使用 3 种低温保护剂(二甲基亚砷(dimethyl sulfoxide, DMSO)、DMSO+海藻糖和 DMSO+胰蛋白酶大豆肉汤)对样本进行的-80℃超低温保存,发现粪便中微生物的活性没有因为 CPA 的添加而增大,但是这种方法能够保持较好的群落结构(通过基因测序确定)。

除了传统保护剂外,还有很多特殊保护剂的组合能够实现样本在略高温度(-20℃)下稳定保存。Qiao Ying 等^[45]开发了一种使用天然深共晶溶剂(natural deep eutectic solvents, NADES)冷冻保存乳酸菌的新方法,研究了在-20℃下,24 h 短期和 180 d 长期低温保存期间乳酸菌的存活率,证明了由甘油和 L-脯氨酸制备的 NADES 能提高细胞膜结构的完整性并有效($P<0.05$)维持嗜热链球菌内两种酶的活性。可见对于微生物的保存还有很多保护剂待开发,将一些新型高效的保护剂用于粪菌保存可能会有更好的效果。

2.2.2 冷冻干燥保存

冷冻干燥保存法利用了干燥、低温和隔绝空气的条件,降低微生物新陈代谢的速度,使细胞的生命活动处于半永久性休眠状态,可以长时间保存且避免细菌的污染和变异。L. Bircher 等^[46]定量对比了冷冻和冻干保存的效果以及保护剂对 6 种厌氧肠道微生物活力和适应性的影响,发现添加蔗糖和菊粉能提高

菌种冻干后的细胞活力和完整细胞的比例。K. El-ah 等^[47]在膳食矿物质平衡的研究中将粪菌冷冻干燥,并在-20℃下保存 10 年,发现其微生物特征依然能保持稳定。

供体粪菌的冷冻已简化 FMT 治疗复发性 CDI 的过程,冻干的粪菌也可能达到类似的效果。Jiang Z. D. 等^[48]将冷冻和冻干的 FMT 样本储存长达 7 个月,其微生物群的组成和治疗功效没有发生显著改变。将粪菌冻干保存后,还可制作成包封的胶囊以治疗疾病。C. Staley 等^[49]将粪菌进行冻干并包封,使用蔗糖、海藻糖和甘露醇作为低温保护剂,在冻干机(-20℃的搁板温度冷冻 36 h,在 30℃下干燥 6 h)中处理后保存于 20℃直至使用,发现冻干制剂满足所有预设目标,包括物理化学性质、包封容易性、不同温度下的稳定性以及体内外微生物群的活力。但也有研究者认为冻干粪菌效果没有冷冻的效果好^[28]。

2.2.3 冷藏保存

冷藏保存法是在 4℃的冷藏箱内保存样本,同时将有机化学溶剂作为保护剂以限制其他细菌的生成,在一定程度上杀死细菌,抑制酶的活性^[33]。最常见的用于粪菌保存的保护介质有乙醇、甲醇、RNA later、FTA(flinchers technology associates)卡、粪便隐血试验(fecal occult-blood test,FOBT)卡和 OMNIgene Gut 试剂盒等,这些是更加适合现场的保存方法,但保存有效期较短。与冷冻相同,用乙醇或甲醇进行冷藏保存是另一类有效的粪菌 DNA 保存方法,但由于这些试剂是“危险化学品”,在偏远地区不容易订购或运输。RNA later 是一种保存 RNA 和 DNA 的无害液体。与乙醇相比,RNA later 的运输限制虽然较少,但其可能会随时间降解,从而降低 DNA 的浓度^[43]。推测粪便样本中残留的 RNA later 可能干扰 DNA 提取过程中的细胞裂解和蛋白质消化,从而抑制 DNA 分离^[43]。FTA 卡易携带,在现场样品收集时最方便。FOBT 卡是临床经常用的保存方法,容易买到,价格便宜、体积小,且易于使患者接受。

S. J. Song 等^[50]用 5 种方法(70%乙醇、95%乙醇、RNA later、FTA 卡和 OMNIgene Gut 试剂盒)保存人类和狗的粪便标本,时间长达 8 周,他们发现 3 种方法(95%乙醇、FTA 卡和 OMNIgene Gut 试剂盒)可以在 4℃下乃至室温稳定保存样本,且不建议使用 70%乙醇。DNA 在 95%~100%的乙醇中保存效果最好,因为高浓度乙醇能更快速的渗透细胞膜并使 DNA 酶失活。他们的实验包含了 1 200 多个样本,为研究者提供了较为全面的参考。M. Papaikovou 等^[51]使用实时荧光定量 PCR 技术评价 7 种市售产

品在不同温度下保存钩虫 DNA 的有效性,发现在 4℃时,60 d 的保存周期内,保存试剂对 DNA 扩增效率没有显著影响,即使不添加保护剂,也可以使样本稳定 7 周以上。

很多研究者自主研发了粪菌保存液。Hao Lilan 等^[52]研发了一种基于离子液体的试剂,该试剂可以在 4℃下 7 d 的储存期内稳定保存粪便样本中微生物群的组成。这说明传统商业试剂的保存效果还有提升改进的空间。

以上的保护剂同样适用于更高的保存温度,如室温。但保存温度越高,可保存的时间就越短,建议在有条件的情况下,使用零下或 4℃的低温保存。在很多 4℃保存粪菌的研究中,都只将 DNA 浓度或群落结构作为测量指标,而没有考虑微生物的活性,说明这些方法可能仅仅为了保证样本的遗传物质不发生改变以进行科学研究,但想要长时间维持较高的菌群活性,还需要在冷冻方案的优化上继续探索。

2.2.4 其他非低温保存

样本的快速干燥能抑制微生物的 DNA 降解。最简单的干燥保存法是将样本去除杂质后直接在温度较高的烘箱中烘干,该方法简单易行,烘干后的样本易于携带和运输。但干燥保存法也有一定的缺陷,比如烘干的最佳温度和时间难以掌握,会影响样本中菌群的稳定性,且烘箱不便于携带。P. J. Johnson 等^[53]评估了有可充电盒的便携式干燥剂室的实用性,旨在研究快速干燥的样本中微生物群落结构的变化,他们在室温下将样本置于该干燥剂系统中 24 h 或 72 h,然后转移至-80℃冰箱,发现与快速冷冻样本相比,此装置中保存的样本仅显示出微小群落变化,而在室温下放置相同时间的样本经历了几次有氧菌或兼性厌氧菌的过度生长。

对常见的保存方法进行总结,如表 1 所示。可以发现每种方法都各有利弊,在实际运用过程中,要结合实验条件及研究目的进行合理选择,将某几种方法结合使用也是可行的。

3 影响保存效果的主要因素

3.1 保存温度

粪菌采集和保存的一般原则^[59]为:1)避免冷冻-解冻循环:冷冻-解冻循环是导致粪便样本 DNA 降解的关键因素,可能导致宏基因组 DNA 质量差。2)避免反复温度波动:剧烈的温度波动是粪便样本中很多细菌致死的主要原因,它可以杀死微生物并加剧 DNA 的降解。3)缩短运输时间:防止微生物不正常的增多或减少,而低温保存可延长运输时间。

表 1 粪便样本常用保存方法的对比
Tab.1 Comparison of common preservation methods for stool samples

保存方法	适用范围	保护介质	优点	缺点	文献
冷冻保存	室内长时间保存	甘油;DMSO; 海藻糖等	抑制微生物生长; DNA 产量高;降低污染机率	设备要求高; 不便于野外研究	[54] [43]
		甲醇; 乙醇(浓度 95%)	成本低;可储存较长时间	DNA 产量低; 不便于运输	[51]
		RNA later	保存 RNA 和 DNA 的无害液体	保存时效短; DNA 纯度低; 价格较贵	[55]
		FTA 卡	可批量存储;保持群落多样性;易运输	样本质量较低; 价格较贵	[56]
冷藏保存	室外短距离/ 短时间保存	FOBT 卡	体积小;易于使患者接受; 易购买且价格便宜	化学成分影响菌群分布	[57]
		OMNigene 试剂盒	更好的维持生物群落结构; DNA 质量高	成本较高	[50]
		海藻糖;蔗糖; 甘露醇;菊粉等	样本便于携带	设备要求高	[58]
干燥保存	室内保存	—	样本便于携带	最佳温度和时间难掌握	[53]

因此,控制运输过程中的温度十分重要。有研究表明,在 4 ℃ 保存条件下,运输时间为 24~48 h,微生物组成没有显著变化^[60],如果样本可以在 4 h 内到达实验室则无需保存^[61],一旦样本到达实验室,应该在-80 ℃ 下长期冷冻保存。在-80 ℃ 冷冻后,粪便样本可保持稳定的微生物群落长达 2 年^[62], -20 ℃ 下的样本贮存时间至少可以达到数月^[63]。S. J. Song 等^[50]研究了 6 种温度情况下粪便中微生物,包括-20 ℃、4 ℃、室温、4 ℃ 转移到室温、冻融循环(-20 ℃ ~ 室温) 和野外条件下经常遇到的高温波动(4 ~ 40 ℃)。这 6 种温度,每种都对应样本保存时所面临的实际温度变化情况,具有研究价值。

在冻结样本之前,建议将粪便分成若干等分,可以防止二次取样时冻融循环对样本的损害^[64]。随着样本开始融化,DNA 也随之迅速降解,很难预测整个样本的解冻时间。粪便等分吸管技术(fecal aliquot straw technique, FAST) ^[64],允许简单且可重复的二次取样。

3.2 保存方法和保存时间

储存方法和储存时间会影响粪便样本中的核酸质量和菌群分布,从而影响微生物组相关数据。V. L. Hale 等^[56]研究表明保存方法和时间显著改变

DNA 浓度和纯度,香农多样性指数在保存方法和周数之间也存在显著差异。J. S. Lim 等^[65]将猪粪储存在-20、4、20、37 ℃ 的环境下,每隔 7 d 取样测试,共保存 28 d,结果表明,随着温度和储存时间的增加,粪便中细菌群落的丰富度不断降低。

3.3 其他

物种不同,研究目的不同,粪便的保存方法就不同,可能需要不同的实验以判断最优方法,不能类推。研究发现,微生物组成的个体差异大于储存时间和收集方法造成的种群变化^[55]。M. Papaïakovou 等^[51]对人粪便样本中钩虫 DNA 的最佳保存方案进行探索,发现在 32 ℃ 下,用 FTA 卡、重铬酸钾和二氧化硅粉末两步干燥工艺进行保存的效果最好。K. Vlčková 等^[66]评价不同贮藏方式对西部大猩猩的粪便细菌群落特征的影响,发现使用 RNAlater 与冷冻保存之间没有 DNA 回收率的显著差异,表明 RNAlater 是此研究目的下替代冷冻的最佳储存方法。在选择保存方式时,除了保存效果,还要考虑其他因素,例如保护剂毒性、成本、运输、样本感染机率和劳动力等。

样本在处理前是否经过均质化,也影响保存结果及后续检测^[35],因为粪便中不同采样点的微生物群体不同。实验前可以通过涡旋增强保护剂对粪

便的渗透^[43]。保存一段时间后的样本若需要进一步应用,可将样本复温,并通过离心的方法分离出缓冲液。

4 结论

本文对低温保存这一过程进行了综述,解释了低温保存的机制,阐述了粪菌保存的意义,归纳了不同情况下样本低温保存方法的成果进展,并提出影响其保存效果的重要因素,得出如下结论:

1)目前的保存方法还存在很多问题:运输温度的允许波动范围和粪便样本的允许转运持续时间仍然是不确定的,需要更多的数据来形成共识;一些保护剂的机理不明确,有待进一步探索。

2)探索新型保护剂,降低保护剂毒性,提高保存效果。在细胞的低温保存中探索出了很多新型高效的保护剂,比如海藻糖^[67]和聚乙烯醇^[17]等,它们能够保护细胞免受低温损伤。M. Hasan 等^[68]将抑制冰重结晶的聚合物(聚乙烯醇和聚乙二醇)作为 CPA,与使用甘油的保存结果相比,解冻后大肠杆菌产量增加了 4 倍,且使用的 CPA 浓度更低。如果将此类保护剂用于粪菌的冷冻保存,可能会得到更好的保存效果,这可以成为未来的研究思路之一。

3)粪菌只有通过冷冻保存才具有较高活性,其他的方法只是保证其中的生物大分子(如 DNA, RNA 和蛋白质等)不发生变异,或维持了微生物群落的稳定性。而低温保存领域的研究者尚未介入粪菌的活菌保存研究。除了优化保护剂的种类以外,还可以深入研究不同的降温程序对粪菌保存后的成活率、DNA 浓度及种群分布等的影响。

4)随着低温生物学和肠道微生物学的发展,不断改进和开发新的粪菌保存方法,能在很大程度上推动粪菌样本库的建立和粪菌移植的临床应用。

本文受上海市青年科技英才扬帆计划(18YF1416200)项目资助。(The project was supported by the Shanghai Youth Science and Technology Talents Sailing Program (No. 18YF1416200).)

参考文献

- [1] HE Qing, LI Xiaoping, LIU Chuan, et al. Dysbiosis of the fecal microbiota in the TNBS-induced Crohn's disease mouse model[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2016, 100(10): 4485–4494.
- [2] TREMAROLI V, BÄCKHED F. Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism[J]. *Nature*, 2012, 489: 242–249.
- [3] CLERCQ N C D, GROEN A K, ROMIJN J A, et al. Gut microbiota in obesity and undernutrition[J]. *Advances in Nutrition*, 2016, 7(6): 1080–1089.
- [4] MAYER E A. Gut feelings: the emerging biology of gut-brain communication[J]. *Nature Reviews Neuroscience*, 2011, 12(8): 453–466.
- [5] JANOFF E N. The microbiome and human disease pathogenesis: how do you do what you do to me...? [J]. *Translation Research*, 2017, 179: 1–6.
- [6] BRINKMAN T J, SCHWARTZ M K, PERSON D K, et al. Effects of time and rainfall on PCR success using DNA extracted from deer fecal pellets[J]. *Conservation Genetics*, 2010, 11(4): 1547–1552.
- [7] MAZUR P, LEIBO S P, CHU E H Y. A two-factor hypothesis of freezing injury: evidence from Chinese hamster tissue-culture cells[J]. *Experimental Cell Research*, 1972, 71(2): 345–355.
- [8] 刘威, 郭明伟, 郭治宇, 等. 胞内冰形成机理研究进展[J]. *制冷学报*, 2018, 39(3): 126–134. (LIU Wei, GUO Mingwei, GUO Zhiyu, et al. Review of the mechanism of intracellular ice formation[J]. *Journal of Refrigeration*, 2018, 39(3): 126–134.)
- [9] 梁玮, 王美霞, 刘宝林. 低温保存对生物样本及其生物大分子的影响[J]. *中国生物医学工程学报*, 2017, 36(5): 615–621. (LIANG Wei, WANG Meixia, LIU Baolin. The effect of cryopreservation on biospecimens and biomacromolecules[J]. *Chinese Journal of Biomedical Engineering*, 2017, 36(5): 615–621.)
- [10] SARIÖZKAN S, BUCAK M N, CANTURK F, et al. The effects of different sugars on motility, morphology and DNA damage during the liquid storage of rat epididymal sperm at 4 °C[J]. *Cryobiology*, 2012, 65(2): 93–97.
- [11] BOTLING J, EDLUND K, SEGERSTEN U, et al. Impact of thawing on RNA integrity and gene expression analysis in fresh frozen tissue[J]. *Diagnostic Molecular Pathology*, 2009, 18(1): 44–52.
- [12] 华泽钊, 任禾盛. 低温生物医学技术[M]. 北京: 科学出版社, 1994: 153–154. (HUA Zhezao, REN Hesheng. *Technology of cryobiology and medical* [M]. Beijing: Science Press, 1994: 153–154.)
- [13] 吕维敏, 黄钢妹, 曾叶, 等. 生物材料冻存中低温保护剂的作用机理及实验研究[J]. *低温技术*, 2014, 42(5): 12–16. (LYU Weimin, HUANG Gangmei, ZENG Ye, et al. The operation mechanism of cryoprotective-agent and experimental study on cryopreservation of biological materials[J]. *Cryogenics*, 2014, 42(5): 12–16.)
- [14] ELLIOTT G D, WANG Shangping, FULLER B J, et al. Cryoprotectants: a review of the actions and applications of cryoprotective solutes that modulate cell recovery from ul-

- tra-low temperatures[J]. Cryobiology, 2017, 76: 74–91.
- [15] WOLANCZYK J P, STOREY K B, BAUST J G. Ice nucleating activity in the blood of the freeze-tolerant frog, *Rana sylvatica*[J]. Cryobiology, 1990, 27(3): 328–335.
- [16] DELLER R C, VATISH M, MITCHELL D A, et al. Synthetic polymers enable non-vitreous cellular cryopreservation by reducing ice crystal growth during thawing[J]. Nature Communications, 2014(5): 1–7.
- [17] CHOI H H, CHO Y S. Fecal microbiota transplantation: current applications, effectiveness and future perspectives[J]. Clinical Endoscopy, 2016, 49: 257–265.
- [18] ZHANG Faming, CUI Bota, HE Xingxiang, et al. Microbiota transplantation: concept, methodology and strategy for its modernization[J]. Protein and Cell, 2018, 9(5): 462–473.
- [19] SURAWICZ C M, BRANDT L J, BINION D G, et al. Guidelines for diagnosis, treatment, and prevention of *Clostridium difficile* infections[J]. American Journal of Gastroenterology, 2013, 108(4): 478–498.
- [20] QURASHI M N, WIDLAK M, BHALA N, et al. Systematic review with meta-analysis: the efficacy of faecal microbiota transplantation for the treatment of recurrent and refractory *Clostridium difficile* infection[J]. Alimentary Pharmacology and Therapeutics, 2017, 46(5): 479–493.
- [21] JIANG Zhidong, ALEXANDER A, KE Shi, et al. Stability and efficacy of frozen and lyophilized fecal microbiota transplant (FMT) product in a mouse model of *Clostridium difficile* infection (CDI)[J]. Anaerobe, 2017, 48: 110–114.
- [22] 向丽园, 张发明. 粪菌移植在艰难梭菌感染治疗中的应用[J]. 临床荟萃, 2018, 33(5): 385–389. (XIANG Liyuan, ZHANG Faming. Application of fecal microbiota transplantation in treatment of *Clostridium difficile* infection[J]. Clinical Focus, 2018, 33(5): 385–389.)
- [23] JEON S R, CHAI J, KIM C, et al. Current evidence for the management of inflammatory bowel diseases using fecal microbiota transplantation[J]. Current Infectious Disease Reports, 2018, 20(8): 20–21.
- [24] 马玉帛, 李婷宇, 曹海超, 等. 粪菌移植的临床研究进展[J]. 中华消化病与影像杂志, 2016, 6(1): 28–35. (MA Yubo, LI Tingyu, CAO Haichao, et al. An update on clinical practice of fecal microbiota transplantation[J]. Chinese Journal of Digestion and Medical Imageology, 2016, 6(1): 28–35.)
- [25] HUANG Linsheng, ZHU Qi, QU Xiao, et al. Microbial treatment in chronic constipation[J]. Science China Life Sciences, 2018, 61(7): 744–752.
- [26] KOOTTE R S, LEVIN E, SALOJÄRVI J, et al. Improvement of insulin sensitivity after lean donor feces in metabolic syndrome is driven by baseline intestinal microbiota composition[J]. Cell Metabolism, 2017, 26(4): 611–619.
- [27] HALE V L, TAN C L, NIU K, et al. Effects of field conditions on fecal microbiota[J]. Journal of Microbiological Methods, 2016, 130: 180–188.
- [28] JIANG Z D, AJAMI N J, PETROSINO J F, et al. Randomised clinical trial: faecal microbiota transplantation for recurrent *Clostridium difficile* infection—fresh, or frozen, or lyophilised microbiota from a small pool of healthy donors delivered by colonoscopy[J]. Alimentary Pharmacology and Therapeutics, 2017, 45(7): 899–908.
- [29] HAN Mo, HAO Lilan, LIN Yuxiang, et al. A novel affordable reagent for room temperature storage and transport of fecal samples for metagenomic analyses[J]. Microbiome, 2018, 6(1): 43.
- [30] FU B C, RANDOLPH T W, LIM U, et al. Characterization of the gut microbiome in epidemiologic studies: the multiethnic cohort experience[J]. Annals of Epidemiology, 2016, 26(5): 373–379.
- [31] PAN P, SKAER C W, WANG H T, et al. Systemic metabolite changes in wild-type C57BL/6 mice fed black raspberries[J]. Nutrition and Cancer, 2017, 69(2): 299–306.
- [32] 王菊霞, 张卫国, 张灵菲, 等. 啮齿动物粪便类固醇的分析方法及其意义[J]. 草业科学, 2015, 32(10): 1668–1674. (WANG Juxia, ZHANG Weiguo, ZHANG Lingfei, et al. Analysis methods and significance of rodent fecal steroid[J]. Pratacultural Science, 2015, 32(10): 1668–1674.)
- [33] RIETMANN S, WALZER C. Parasitological examination of common hippopotamus (*hippopotamus amphibius*) faeces in the gamba complex of protected area in gabon[J]. Wiener Tierärztliche Monatsschrift, 2014, 101(3/4): 66–73.
- [34] MOWRY R A, GOMPPER M E, BERINGER J, et al. River otter population size estimation using noninvasive latrine surveys[J]. Journal of Wildlife Management, 2011, 75(7): 1625–1636.
- [35] HSIEH Y H, PETERSON C M, RAGGIO A, et al. Impact of different fecal processing methods on assessments of bacterial diversity in the human intestine[J]. Frontiers Microbiology, 2016(7): 1643.
- [36] 王华, 杜立业, 李华. 微生物液氮超低温保存研究进展[J]. 食品与生物技术学报, 2011, 30(1): 1–5. (WANG Hua, DU Liye, LI Hua. Progress in cryopreservation of microorganism in liquid nitrogen[J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2011, 30(1): 1–5.)
- [37] BAHL M I, BERGSTRÖM A, LICHT T R. Freezing fecal samples prior to DNA extraction affects the firmicutes to bacteroidetes ratio determined by downstream quantitative

- PCR analysis [J]. *Fems Microbiology Letters*, 2012, 329 (2): 193–197.
- [38] FONSECA F, MARIN M, MORRIS G J. Stabilization of frozen *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* in glycerol suspensions; freezing kinetics and storage temperature effects [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72(10): 6474–6482.
- [39] TANG Guihua, YIN Wen, LIU Wenen. Is frozen fecal microbiota transplantation as effective as fresh fecal microbiota transplantation in patients with recurrent or refractory *Clostridium difficile* infection; a meta-analysis? [J]. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 2017, 88(4): 322–329.
- [40] COSTELLO S P, CONLON M A, VUARAN M S, et al. Faecal microbiota transplant for recurrent *Clostridium difficile* infection using long-term frozen stool is effective; clinical efficacy and bacterial viability data [J]. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 2015, 42(8): 1011–1018.
- [41] FOUHY F, DEANE J, REA M C, et al. The effects of freezing on faecal microbiota as determined using MiSeq sequencing and culture-based investigations [J]. *PloS one*, 2015, 10(3): e0119355.
- [42] AGUIRRE M, ECK A, KOENEN M E, et al. Evaluation of an optimal preparation of human standardized fecal inocula for in vitro fermentation studies [J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2015, 117: 78–84.
- [43] HORNG K R, GANZ H H, EISEN J A, et al. Effects of preservation method on canine (*canis lupus familiaris*) fecal microbiota [J]. *Peer J Preprints*, 2018, 6: e4827.
- [44] KERCKHOF F M, COURTENS E N P, GEIRNAERT A, et al. Optimized cryopreservation of mixed microbial communities for conserved functionality and diversity [J]. *PloS One*, 2014, 9(6): e99517.
- [45] QIAO Ying, CAI Haoliang, YANG Xi, et al. Effects of natural deep eutectic solvents on lactic acid bacteria viability during cryopreservation [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2018, 102(13): 5695–5705.
- [46] BIRCHER L, GEIRNAERT A, HAMMES F, et al. Effect of cryopreservation and lyophilization on viability and growth of strict anaerobic human gut microbes [J]. *Microbial Biotechnology*, 2018, 11(4): 721–733.
- [47] ELAHE K, BRETT W M, DANIELLE M, et al. Integrity of the human faecal microbiota following long-term sample storage [J]. *PloS One*, 2016, 11(10): e0163666.
- [48] JIANG Z D, ALEXANDER A, KE S, et al. Stability and efficacy of frozen and lyophilized fecal microbiota transplant (FMT) product in a mouse model of *Clostridium difficile* infection (CDI) [J]. *Anaerobe*, 2017, 48: 110–114.
- [49] STALEY C, HAMILTON M J, VAUGHN B P, et al. Successful resolution of recurrent *Clostridium difficile* Infection using freeze-dried, encapsulated fecal microbiota; pragmatic cohort study [J]. *American Journal of Gastroenterology*, 2017, 112(6): 940–947.
- [50] SONG S J, AMIR A, METCALF J L, et al. Preservation methods differ in fecal microbiome stability, affecting suitability for field studies [J]. *mSystems*, 2016, 1(3): e00021-16.
- [51] PAPAIAKOVOU M, PILOTTE N, BAUMER B, et al. A comparative analysis of preservation techniques for the optimal molecular detection of hookworm DNA in a human fecal specimen [J]. *PloS Neglected Tropical Diseases*, 2018, 12(1): e0006130.
- [52] HAO Lilan, XIA Zhongkui, YANG Huanming, et al. Ionic liquid-based reagents improve the stability of midterm fecal sample storage [J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2017, 139: 68–73.
- [53] JOHNSON P J, HARGREAVES L L, ZOBRIST C N, et al. Utility of a portable desiccant system for preservation of fecal samples for downstream 16S rRNA amplicon sequencing [J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2018, 146: 1–6.
- [54] MORRIS L S, MARCHESI J R. Assessing the impact of long term frozen storage of faecal samples on protein concentration and protease activity [J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2016, 123: 31–38.
- [55] DOMINIANNI C, WU J, HAYES R B, et al. Comparison of methods for fecal microbiome biospecimen collection [J]. *BMC Microbiology*, 2014, 14(1): 103.
- [56] HALE V L, TAN C L, KNIGHT R, et al. Effect of preservation method on spider monkey (*ateles geoffroyi*) fecal microbiota over 8 weeks [J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2015, 113: 16–26.
- [57] WONG W S W, CLEMENCY N, KLEIN E, et al. Collection of non-meconium stool on fecal occult blood cards is an effective method for fecal microbiota studies in infants [J]. *Microbiome*, 2017, 5(1): 114.
- [58] GHOLIB G, HEISTERMANN M, AGIL M, et al. Comparison of fecal preservation and extraction methods for steroid hormone metabolite analysis in wild crested macaques [J]. *Primates*, 2018, 59(3): 281–292.
- [59] WU W K, CHEN C C, PANYOD S, et al. Optimization of fecal sample processing for microbiome study—the journey from bathroom to bench [J]. *Journal of the Formosan Medical Association*, 2018, 118(2): 545–555.
- [60] TEDJO D I, JONKERS D M, SAVELKOUL P H, et al. The effect of sampling and storage on the fecal microbiota composition in healthy and diseased subjects [J]. *PloS*

- One, 2015, 10(5): e0126685.
- [61] CARROLL I M, RINGEL-KULKA T, SIDDLE J P, et al. Characterization of the fecal microbiota using high-throughput sequencing reveals a stable microbial community during storage[J]. *PLoS One*, 2012, 7(10): e46953.
- [62] SHAW A G, SIM K, POWELL E, et al. Latitude in sample handling and storage for infant faecal microbiota studies: the elephant in the room? [J]. *Microbiome*, 2016, 4(1): 40.
- [63] KIM D, HOFSTAEDTER C E, ZHAO C, et al. Optimizing methods and dodging pitfalls in microbiome research[J]. *Microbiome*, 2017, 5(1): 52.
- [64] ROMANO K A, DILLMCFARLAND K A, KASAHARA K, et al. Fecal aliquot straw technique (FAST) allows for easy and reproducible subsampling: assessing interpersonal variation in trimethylamine-N-oxide (TMAO) accumulation [J]. *Microbiome*, 2018, 6(1): 91.
- [65] LIM J S, YANG S H, KIM B S, et al. Comparison of microbial communities in swine manure at various temperatures and storage times[J]. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 2018, 31(8): 1373–1380.
- [66] VLČKOVÁ K, MRÁZEK J, KOPEČNÝ J, et al. Evaluation of different storage methods to characterize the fecal bacterial communities of captive western lowland gorillas (*gorilla gorilla gorilla*) [J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2012, 91(1): 45–51.
- [67] 王美霞, 梁玮, 叶萍, 等. 海藻糖和胎牛血清对人乳腺细胞 HBL-100 低温保存的影响[J]. *制冷学报*, 2017, 38(5): 107–113. (WANG Meixia, LIANG Wei, YE Ping, et al. Effects of trehalose and fetal bovine serum on cryopreservation of HBL-100 human breast cells[J]. *Journal of Refrigeration*, 2017, 38(5): 107–113.)
- [68] HASAN M, FAYTER A E R, GIBSON M I. Ice recrystallization inhibiting polymers enable glycerol-free cryopreservation of micro-organisms[J]. *Biomacromolecules*, 2018, 19(8): 3371–3376.

通信作者简介

梁玮,女,助理研究员,上海交通大学医学院附属新华医院,环境与儿童健康重点实验室,(021)25078849,E-mail: liangwei@xinhumed.com.cn。研究方向:生物样本的低温保存、生物样本库管理科学。

About the corresponding author

Liang Wei, female, research assistant, Ministry of Education and Shanghai Key Laboratory of Children's Environmental Health, Xinhua Hospital Affiliated to Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, + 86 21-25078849, E-mail: liangwei@xinhumed.com.cn. Research fields: cryopreservation of biospecimen and management science of biobank.