

균주의 보존

1 개요

미생물은 실험실에서 배양 및 계대 중에 그 특성이 변화할 수 있으므로 미생물을 대상으로 하는 연구실에서는 균주 보존의 중요성을 인식하고 균주를 보관, 유지할 수 있는 방법을 강구하여야 한다. 미생물은 그 종류에 따라 보존이 용이한 것부터 아주 곤란한 것까지 다양하므로 성공적인 균주의 보존을 위하여는 인공적으로 배양이 가능한 균주의 활성을 유지시키면서 필요한 기간 동안 항상 주의를 기울여야 한다. 미생물의 보존에는 여러 가지 방법이 제시되고 있으며 균주에 따라 최적 보존 조건이 달라질 수 있고, 각각 장단점이 있으므로 실험자는 다음 사항을 고려하여 자신의 목적에 맞는 적절한 방법을 선정하여 보존하여야 한다.

첫째, 보존하고자 하는 균주의 생물 활성이 유지되어야 한다. 세포의 사멸은 보존 과정이나 보존 중에 일어날 수 있으므로 일반적으로 보존하려는 배양액 중 세포 농도를 높게 유지하고 보존 과정 중에 사멸되는 세포의 수를 최소화하는 방법을 강구하여야 한다. 일단 보존된 균주는 주기적으로 생물 활성을 확인하여 보존 중 유실을 방지하여야 한다.

둘째, 동일 균주를 보존한다고 하더라도 실험실에서 다루는 균주는 동일 균주의 집단이므로 자연적 돌연 변이 등에 의해 다른 성질을 갖는 균주가 자연적으로 섞여 있을 수 있다. 이러한 경우 보존 과정 중에는 배양액 중의 일부 세포가 필연적으로 사멸하므로 특히 세포 농도가 낮은 경우 생존된 세포는 저항성 균주만이 선택되어 보존될 가능성이 있다.

셋째, 보존 기간 동안 균주의 특성이 유지되어야 한다. 보존 중 균주는 돌연변이 또는 기존에 보유하고 있는 플라스미드의 소실 등으로 유전적인 변화가 초래될 수 있으므로, 계대 횟수나, 조작에 소요되는 시간을 최소화하여 보존 대상 균주가 영양 상태에 있는 시간을 최소화하는 등의 조치를 취하여야 한다.

넷째, 기본적으로 미생물에서 사용되는 균주는 순수하게 유지되어야하므로 균주가 적절히 보존되도록 주의하여야 한다. 보존 전후에 균주의 특성을 확인하고 연속적인 보존 과정 중에 오염기회를 최소화하여 올바른 균주가 보존되도록 하여야 한다.

다섯째, 보존 균주의 기록 및 유지 관리는 매우 중요하다. 보존균주는 고유번호를 부여하여 관리하며, 분리원, 분리자 등 관련자료를 필히 기록하여 유지·관리하여야 한다.

마지막으로 여러 가지 사항을 고려하여 보존 방법을 설정할 때 균주의 보존에 필요한 시약, 배지 등의 재료와 소요되는 장비와 함께 인력과 기록 관리에 관한 비용, 보존 장소의 선정에 관한 비용 등이 고려되어야 한다. 비용이 고려되지 않은 균주의 보존은 특히 장기간의 보존시 균주 및 균주 기록의 부적절한 관리 등의 문제를 야기할 수 있다.

2 단기 보존 방법

1. 계대 배양

세균 보존의 전통적인 방법은 정기적으로 신선한 배지에 옮기는 것이다. 구체적 계대 방법은 개체, 배지, 외부 조건 등에 따라 다양하다. 이러한 연속적인 계대 배양의 단점은 별도의 보관 장소가 필요하고 오염, 균주번호 또는 균주명의 오기, 변형체 또는 돌연변이체의 선택, 균주의 손실 등의 위험이 있어 장기 보관에는 적절하지 않다. 보존을 위한 계대 배양에는 제한배지가 주로 사용되는데 미생물의 대사 속도를 저하시켜 계대 간격을 늘릴 수 있기 때문이다. 그러나 일부 세균은 배지 중에 존재하는 특정 성분을 이용하여 성장하거나 특이적인 생리 활성을 유지하기 때문에 복합배지를 사용하여야 한다. 영양배지의 사용시에는 생장이 가속되거나 대사 산물이 축적되므로 계대 주기를 단축하여야 한다. 흔히 고체 배지상에서 유지되는 계대 배양에

의한 보존의 가장 간단한 방법은 상온에서 시험관째로 보관하는 방법이다. 이렇게 보관할 때는 실험실의 환경이 적절히 조절되지 않는 경우에는 건조되지 않도록 주의할 것을 기울여야 한다. 한편 균주의 성장 속도를 늦추기 위하여는 균주를 냉장고에 보관하는 것이 우수한 결과를 보인다. 대부분의 세균은 이러한 방법으로 3~5개월간의 계대 간격으로 보존이 가능하다. 계대의 주기는 실험실에서의 경험에 의하여 결정되어야 하며, 변이체가 선택적으로 보존되는 것을 방지하도록 계대를 최소화하는 한편 손실을 방지하도록 보존 균주를 이중으로 유지하는 등의 조치가 필요하다. 매 계대 후에는 형질의 변화를 확인할 수 있도록 간단하게라도 주기적으로 확인하여야 한다. 균주를 계대할 때에는 내성으로 변이체가 선택될 수 있는 확률이 더 높으므로 단일 집락을 선택하면 안된다.

2. 광유 침지법

광유 침지법 (mineral oil overlaying)은 세균을 멸균된 광유 또는 액상 파라핀에 침지하는 비교적 간단하고 저렴한 방법으로 수 개월 또는 수 년간 성공적으로 보존할 수 있다. 이 방법에 의해 보존할 경우, 대부분 첨가되는 광유에서 오염이 발생하므로 멸균에 주의를 기울여야 한다. 광유를 멸균할 때는 고압증기 멸균보다는 170°C에서 1~2시간 가열 멸균한다. 이 방법으로 균주를 보관할 때에는 균주를 적절한 배지에서 한천 사면배양 하거나 천자배양 또는 액체 배양하고, 균주가 적정하게 성장되었을 때 멸균된 광유를 무균적으로 최소한 2 cm의 두께로 가하여 건조를 방지하고 성장을 저해하도록 한다 (사면 한천 배양의 경우 완전히 잠기도록 한다). 마개를 한 후 실온 압소에 수 년간 보존할 수 있다. 광유가 덮인 배양체가 담긴 시험관은 냉장 온도에서 오일을 흐르지 않도록 주의하여 보관한다. 광유 밑부분의 미생물 배양체는 멸균된 needle을 취하여 신선한 배지로 옮겨 배양할 수 있고, 추가적으로 광유 윗부분에 중층 하여 보존할 수 있다. 접종 시에는 화염에 달구어진 needle에 의하여 오일이 비등하여 주위와 실험자를 오염 시킬수 있으므로 주의하여야 한다. 원래의 미생물 배양체는 계대배양체가 오염되었거나 변형된 특성을 보일 때 조치할 수 있도록 최소한 수주 동안 유지하여야 한다. 이 방법의 단점은 일반적인 계대 방법과 동일하나, 추가적으로 오일을 중층해야 한다는 것이다.

3. 동결

세포를 동결 (freezing) 시켜 대사 활동을 정지시킨 후 세포를 휴지 상태로 하여 보존하는 방법이다. 일반적으로, 보존 온도가 낮을수록 보존성은 양호하다. 세포의 동결시 동결 속도에 따라 다른 결빙 결과가 나타나는데 이는 세포의 동결시 동결점을 경계로하여 얼음 결정의 생성에 의해 세포가 손상을 받을 수 있기 때문이다. 대부분의 미생물은 -20°C 에서 비교적 잘 보관할 수 있으나 실제에 있어서는 미생물의 장기적인 보존에는 권장되지 않는데 공융점 (eutectic point)에서는 전해질이 농축되어 보존 중인 세포에 해를 줄 수 있으며 (NaCl의 공융점: -20°C) 이 온도에서는 작은 온도 변화에 의하여 물의 용융이 일어날 수 있어 보존 균주에 해를 끼칠 수 있다. 그러나 일부 세균은 -20°C 에서 6개월에서 1년 동안 보존할 수 있다. -70°C 에서 세균의 보존은 보통 -20°C 의 냉동기 보다 우수하다. 초저온 냉동 절차는 냉각 과정에서의 세포의 손상을 방지하기 위해 글리세롤 또는 DMSO 같은 냉해방지제를 사용하여 세균을 냉동하는 과정을 포함한다. 많은 세균들은 이 방법을 사용하면 몇 년 동안 성공적으로 보존된다.

일반적으로 활발하게 분열하는 어린 세포보다는 정지기의 세포들이 동결에 대해 저항성을 갖는다. 일반적인 보존에서처럼 동결보존의 경우에도 세포의 농도를 가급적 높게 하는 편이 생존율과 보존성에서 우수하다. 동결 보존시 용액 중에 특별히 요구되지 않는 한 가능한 전해질이 포함되지 않도록 하며, 보존 대상 균주와 동결 억제제 (DMSO 또는 글리세롤)와 혼합 후에 가능한 빨리 동결 처리 과정을 실시하도록 한다. 단, 보존하고자 하는 균주에 따라서는 순차적으로 온도를 낮추는 과정이 요구되는 경우도 있다. 특히 동물세포 등의 저장시는 -20°C 까지는 분당 1°C 의 냉각 속도로 천천히 동결 한후 가급적 빨리 보존 온도에 보존하는 방법이 권장되나 미생물의 경우 -70°C 냉동기에 정치하는 방법으로 동결하여도 특별히 문제가 발생하지는 않는다. 균주의 동결 보존 시 반복적인 용해와 동결은 미생물의 보존성에 큰 영향을 끼치므로 절대로 피해야 한다. 그러므로 보존 시 소량으로 분주하여 여러 개를 보존하고 재생 시 한 개씩 꺼내어 사용하는 것이 권장된다. 한편, 동결 시 직경 2~3 mm의 glass bead나 상업적으로 이용이 가능한 ceramic bead를 균액에 넣어 균주가 흡착되도록 한 후 여분의 균액을 제거하고 동결시키고 사용시 비드 하나씩을 취하여 배지에 접종하는 방법도 사용 가능하다. 동결된 균주의 재생 시에는 가능한 빨리 용해시

키는 것이 좋다. 즉 배양 온도 정도의 온수 중에서 균주가 보존된 용기를 담그고 가볍게 흔들어서 녹이는 것이 좋다. 동결 보존 시의 용기는 유리를 사용하는 경우 동결에 의해 동파되지 않도록 경질의 유리 제품을 사용하여야 하며 상업적으로 제공되는 동결보존용 바이알 등을 사용하는 것도 편리한 방법이다. 균액을 용기에 넣을 때는 동결에 의한 용량의 증대를 감안하여 완전히 동결되더라도 넘치지 않을 정도의 여유를 갖도록 주의한다. 동결 보존시 또 다른 문제 발생의 소지는 갑작스런 정전이나 장비의 이상에 의한 온도의 상승이다. 이 경우 단기적으로는 드라이아이스 등으로 대처할 수 있으나 평소에 back-up system을 갖추거나 냉동고를 적절한 온도가 유지되는 별도의 기기실에 보존하는 등 관리에 주의를 기울여 문제 발생의 소지를 사전에 차단하는 것이 가장 중요하다.

4. 건조

대부분의 미생물배양체는 실험 배지상에서 건조된 상태로 놓아두면 죽지만 일부 세균은 담체와 결합하여 건조시키면 상당히 장기간 보존이 가능하다고 알려져 있다. 포자 형성 세균은 멸균되어 공기 건조된 토양과 혼합하여 수년간 보존될 수 있다. 토양 보존시 포자현탁액 (1ml)을 멸균 토양이 있는 시험관에 가하고 육안으로 보아 건조될 때까지 상온에서 방치한다. 시험관을 멸균된 고무마개로 봉하고 냉장 온도에서 보관한다. 멸균된 여과지 스트립이나 디스크 상에서 박테리아를 건조하여 보관하는 것은 비교적 간단하고 저렴한 방법이다. 이 방법은 특히 정도관리용 표준균주를 보존하는데 이상적이다. 동일한 균주를 포함하는 많은 디스크가 한 시험관 안에 보관될 수 있다. 사용시에는 멸균된 핀셋으로 무균적인 조작으로 디스크를 하나 꺼내어 적절한 액체 배지나 평판 배지상에 접종하여 배양할 수 있다. 장내세균과의 세균들은 이 방법으로 수년간 보존이 가능하다. 여과지에 의한 건조 방법의 경우, 멸균된 여과지를 ml당 10^8 이상의 세균 부유액으로 포화시킨 다음 공기 건조하거나 진공 건조한다. 진공 중에서의 건조가 생존율이 훨씬 높은 것으로 알려져 있다. 이렇게 건조가 된 스트립이나 디스크는 시험관에 넣어 밀봉한 다음 데시케이터에 보관하거나 멸균된 두 층의 플라스틱 판 사이에 보관한다. 보관 시 냉장 온도에서 보관하면 보존기간의 연장이 가능하다. 특정 세균의 경우 건조된 젤라틴 액적이나 디스크 상에서 보존이 가능하다. 보존 온도는 어느 경우에도 성공적인 보존을 위하여 중요하다. 일

반적으로 -20℃에서 보존하는 것이 4℃나 실온에서 보존하는 것보다 우수하다. 젤라틴 배양은 다음과 같이 실시한다. 균주를 적절한 배지에서 배양하고 무균적으로 원심분리하여 수확한다. 침전물을 소량의 액상 배지에 부유시킨 다음 용융하여 30℃로 유지한 2~5 ml의 영양젤라틴에 ml당 10^8 내지 10^{10} 되도록 혼합한다. 멸균된 파스퇴르 피펫이나 주사기를 사용하여 1회용 페트리디쉬에 1방울씩 떨어뜨린다. 페트리디쉬를 오산화인이 들어있는 데시케이터에 정치하고 감압한다. 적하된 액적이 건조된 후 건조된 젤라틴 액적을 마개시험관에 옮기고 냉장고에 보관한다. 균주를 재생할 때는 건조된 젤라틴 액적을 적절한 배지에 옮겨 배양한다.

2 장기 보존 방법

장기보존 방법은 일반적인 미생물 실험실에서 적용하기에는 어려우며, 균주보존센터 혹은 기관에서 일괄적으로 관리하는 것이 효율적인 것으로 생각된다. 여기에서는 간략히 원리와 적용에 대하여 기술하기로 한다.

1. 동결건조

동결건조 (Freeze-drying, Lyophilization)는 다른 방법에 비해 조작이 복잡하지만 보존 균주가 변이를 일으키기 어렵고, 세균과 다른 미생물들을 장기간 보관하는 가장 경제적이고 효과적인 방법 중의 하나이다. 생리적으로 다양한 세균과 세균성 바이러스들이 이 기술에 의해 성공적으로 보존되어 이것은 50년 이상 동안 생존도를 유지하였다. 동결 건조는 감압 하에서 승화시킴으로써 동결된 세균 현탁액으로부터 수분을 제거하는 것을 말한다. 동결 건조는 보존하고자 하는 균주 배양액을 동결 한 후 압력을 낮추어 배양액이 얼어버린 상태에서 바로 승화에 의하여 건조시키는 방법으로 물질의 상태를 원래대로 보존할 수 있으므로 일반 식품 등의 보존에 널리 이용된다. 이때 동결 방법이나 건조 과정을 조절하여 균체의 손상을 최소화 할수 있는 방법이 강구되어야 한다. *Aspergillus*나 *Penicillium* 등 소형 포자를 형성하는 것은 어느 정도 보존을 기대할 수 있으나 이 경우 될 수 있는 한 많은 포자 (10^6 cells/ml)를 20% 탈지분유에 부유시켜 동결 건조한다. 동결에서와 같이 동결 속도와 동결 온도가 세포의 활성과 건조의 효율성에 중요한 역할을 한다. 일반적으로 세균의 경우 통

상 -70℃에서 동결하는 방법은 크게 영향을 주지 않는다. 한편 공용점에서는 세포가 손상을 받을 우려가 있으므로 공용점 이하까지 동결하여야 한다. 효율적인 동결건조를 위하여는 가급적 표면적이 커지도록 보존하고자 하는 균액의 양을 조절한다. 감압 시에 예비 동결된 시료는 승화열에 의하여 동결 상태를 유지하는데 이때 시료의 두께는 건조의 효율에 중요한 변수가 된다. 동결 건조는 다음의 각 단계로 수행된다.

1) 예비동결

사용하는 앰플의 용량에 따라 시료를 넣은 후 예비 동결을 실시한다. 예비 동결 조작은 -30℃ 이하의 온도로 실시하며 메탄올 등의 냉매에 드라이아이스 등을 가하여 냉각시켜 시료가 들어 있는 앰플을 담구거나 또는 간단히 초저온 냉동고 안에서 2시간 이상 방치하여 동결시킬 수 있다. 이 경우 건조 과정에서 동결된 시료가 용해되지 않도록 주의하여야 한다.

2) 건조

건조는 1차 건조와 2차 건조로 구분되며 1차 건조는 동결 상태의 수분을 승화시키는 과정이며 이때 샘플은 승화열에 의하여 동결된 상태를 유지하며 온도는 기기에 따라 공용점이하를 유지하도록 적절히 조절하여 동결 건조 시간을 단축할 수 있다. 2차 건조는 일단 승화에 의하여 수분이 제거된 샘플에서 추가적인 건조를 통하여 물질의 결합수 등 잔여 수분을 제거시키는 과정이다. 실제의 과정상 1차 건조와 2차 건조의 시기가 명확히 구분되지는 않는다.

3) 밀봉

미생물의 건조는 주로 앰플에 의해 이루어지며 단관식과 이중관식이 흔히 사용된다. 단관식에서는 동결 건조된 균체가 봉입된 앰플을 다지관에 장착하여 감압하에서 Gas torch 등으로 용융하여 밀봉하여 진공 상태에서 균주를 보관한다. 이중관식에서는 내부 바이알에 샘플을 첨가하고 동결 건조시킨 후 멸균된 필터페이퍼 등으로 바이알의 입구를 봉한 후 외부 바이알에 삽입하고 감압하여 진공상태를 만든후 gas torch로 유리관을 용융하여 제조한다. 용융후에는 미세한 구멍이 남아 있을 수 있으므로 통상 1~2일 후에 앰플의 진공도를 검사하여야 한다. 동결 건조된 미생물은 산소, 빛, 온도 등에 의하여 영향을 받는다. 앰플의 보존은 실온에서도 가능하나, 저온

에서 보존하면 보존 기한을 늘릴 수 있다.

한편 동결 건조의 변법으로 동결에 약한 균주의 보존을 위하여 액상인 채로 건조하는 L 형 건조가 적용되기도 한다.

2. 액체질소보존

액체질소보존 (ultrafreezing) 방법은 동결보존법의 한 방법이다. 동결건조가 곤란한 세균 종의 장기간의 보존은 액체질소의 동결온도 (-196℃) 또는 기상온도 (-150℃)에서 수행된다. 이 방법은 미생물 뿐만 아니라 동물이나 식물 세포의 보존에도 적용되며 가장 적용 범위가 넓은 보존 방법이다. 액체질소 상에서의 보존 시 미생물의 생존은 특히 동결속도에 따라 보존성이 현저히 좌우되기 때문에 온도 조절에 주의를 요한다. 액체 질소 상에서 미생물을 보존할 때 일반적인 주의 사항은 동결 보존을 참조한다. 액체 질소는 보존 중 기화하여 계속 소실되므로 액체질소의 양이 항상 일정한 수면이 유지되도록 주기적으로 액체질소의 높이를 확인하여야 하며 부족 시 즉시 보충해 주어야 한다. 액체 질소의 보충시기는 보관장소의 온도 및 뚜껑의 개폐 빈도에 따라 다르며, 관리자는 항상 적절한 수준을 유지할 수 있도록 주의하여야 한다.

표 1. 세균 속의 보관방법에 따른 일반적인 보존기간

속 (Genus)	계대 ¹	광유침지 (년)	동결보존 (년)	동결건조 (년)	액체질소 (년)
<i>Acetobacter</i>	1~2월	1	1~3	>40	>40
<i>Achromobacter</i>	1월	1~2	1~3	>40	>40
<i>Acinetobacter</i>	1주			>40	>40
<i>Actinobacillus</i>	1주		2~3	>40	>40
<i>Actinomyces</i>	1월		2~3	>40	>40
<i>Agrobacterium</i>	1~2월	1~2		>40	>40
<i>Arthrobacter</i>	1~2월	1~2		>40	>40
<i>Bacillus</i>	2~12월	12~3		>40	>40
<i>Bacteroides</i>	1주	1		>40	>40
<i>Bifidobacterium</i>	1주			>40	>40
<i>Chromatium</i>	1월			>5	>40

(계 속)

속 (Genus)	계대 ¹	광유침지 (년)	동결보존 (년)	동결건조 (년)	액체질소 (년)
<i>Clostridium</i>	6~12월	1~2	2~3	>40	>40
<i>Corynebacterium</i>	1~2월	1	1~2	>40	>40
<i>Enterobacter</i>	1~4월	1~2		>40	>40
<i>Erwinia</i>	1~4월	1~2		>40	>40
<i>Escherichia</i>	1~4월	1~2		>40	>40
<i>Flavobacterium</i>	1월	2		>40	>40
<i>Gluconobacter</i>	1월			>40	>40
<i>Haemophilus</i>	1주	1월 (37℃)		>40	>40
<i>Klebsiella</i>	1~4월	1	1~2	>40	>40
<i>Lactobacillus</i>	1주			>40	>40
<i>Methanobacterium</i> ²	1월			> 5	>40
<i>Methanomonas</i> ²	1월			> 5	>40
<i>Micromonospora</i>	1월			>40	>40
<i>Neisseria</i>	1월	1		>40	>40
<i>Nocardia</i>	1~4월	1	1~2	>30	>40
<i>Proteus</i>	1~2월	1	1~2	>40	>40
<i>Pseudomonas</i>	1~3월			>40	>40
<i>Spirillum</i> ³	1주	1			>40
<i>Staphylococcus</i>	1~2월			>40	>40
<i>Streptococcus</i>	1~2월	1	1~3	>40	>40
<i>Streptomyces</i>	1~8월		1~2	>40	>40
<i>Xanthomonas</i>				>40	>40

1. 계대의 계획은 배지종류에 따라 정해진다.
시간은 대략적이며 종간의 변화가 속내에서 일어난다.
2. 종에 따라 상이하다.
3. *Spirillum volutans*.

3 진균의 보존

진균을 계대 보존할 경우는 원칙적으로 저영양 배지가 바람직하며 일반적으로 1% 포도당이 가해진 Sabouraud 배지나 potato dextrose 배지 등이 흔히 사용된다. 진균

의 계대는 약 3개월 마다 실시하고 공기가 잘 통하는 실내에 보존한다. 냉장보존이 가능할 경우 약 4개월마다 계대해도 좋으나 피부사상균은 냉장보존이 부적합하다. 방선균의 계대배양은 brain heart infusion 반고형 배지를 사용하여 천자배양하며 실온에 보존하고 냉장 보존을 해서는 안된다. 효모성 진균은 세균처럼 동결과 동결건조방법으로 보존할 수 있다. 사상성 진균의 경우 가능하면 포자를 보존하여야 하며, 동결건조 할수 없는 포자 비형성 균주는 균사체 (mycelium)를 보존한다. 포자를 형성하는 사상성 진균은 동결건조에 의하여 보존 가능하다. 진균을 최대한 포자형성 최적조건에서 배양해야만 동결과 건조 과정에서 충분한 포자가 생존할 수 있다. 진균 배양 시험관이나 페트리디쉬 내로 멸균된 탈지유 (skim milk) 2 ml를 조심스럽게 분주한 후 피펫을 사용하여 배지 표면을 천천히 긁어 포자 및 균사체를 부유시킨다. 특히 *Aspergillus*, *Penicillium* 그리고 다른 건조된 포자들이 날리지 않도록 조심한다. 포자 부유액을 탈지분유가 들어 있는 시험관에 옮기고 혼합한다. 이 때 포자 부유액의 농도는 적어도 10^6 spores/ml 이 되어야 한다. 포자 부유액을 2시간이내에 동결 건조용 바이알에 0.2 ml씩 분주한다. -70°C 이하 냉동고에 넣어 예비 동결시키고 통상적인 동결 건조 방법에 따라 동결건조 할 수 있다. 사상성 진균의 경우 동결건조는 권장되지 않는다. 포자 비형성 균주는 동결을 위해 고형 배지에서 생장시킨다. 균사체가 있는 진균의 경우는 균사체는 피펫으로 긁을 경우 부러지기 쉬우므로, 10% 글리세롤에 부유시킨 후 그 부유액 0.5 ml를 각 동결용 바이알에 분주하여 동결한다. 균사체가 끈적거리는 진균은 글리세롤에 보존한다. 이 경우 균사체가 부러지지 않고 배지에서 깊이 박혀 성장하므로, 멸균된 spatula로 새로운 생장점 (hyphal tips)이 포함된 플러그로 도려낸다. 3~4 개의 플러그를 약 0.4 ml의 10% 글리세롤이 들어있는 동결용 바이알에 담아 동결 보존한다.

4 세포주 및 바이러스주의 보존

바이러스는 일반적으로 특별한 보존제 없이 낮은 온도 (-70°C 또는 -196°C)에서 일정기간 보존이 가능하다. 일반적인 보존 방법은 배양세포에 적정량의 바이러스를 접종하고, 바이러스가 감염된 세포를 세포배양기에서 배양한다. 세포 병변효과가 나타나면 세포 배양배지를 원심 분리하여 상층액을 취하고 새로운 시험관에 옮겨서

-70℃ 초저온 냉동고에 보관하거나 액체 질소 탱크에 보관한다. 이를 재생할 시에는 동결보관된 바이러스를 꺼내어 37℃ 항온수조에서 즉시 녹인 후 무균적으로 시험관을 열고 적정량의 바이러스를 배양세포에 접종한다. 바이러스가 감염된 세포를 세포 배양기에서 배양하여 바이러스를 확인 동정한다. 사람이나 동물세포주의 경우 세포가 완전히 단층배양되면 증식배지를 버리고 세포계대용 PBS (incomplete PBS)로 수세한다. 1~2 ml 정도의 0.25%의 트립신 용액을 세포배양용기에 넣고 30~60초간 처리한다. 여분의 트립신을 버리고 세포 단층이 모두 떨어질 때 까지 세포배양용기를 37℃에서 배양한다. 적량의 증식배지에 세포를 부유한 후 100 g (1,500 rpm)에서 3분간 원심분리하고 상층액을 버린다. 새로운 증식배지를 이용하여 세포침전물을 적절한 배수로 희석한 후 새로운 배양용기에 배양한다. 이때 단층배양이 이루어지는 시간은 세포에 따라 다르지만 3~5일이 소요되며 5~7일에 한번씩 계대 배양 한다. 세포주는 일반적으로 DMSO로 처리하여 낮은 온도 (-70℃ 또는 -196℃)에서 일정기간 보존이 가능하다. 보존의 경우에는 계대에서와 같이 세포주를 침전한 후 세포 보존용 배지 (10% DMSO, 증식배지)를 사용하여 적절한 세포 농도로 부유시킨다. 4℃에서 1시간, -20℃에서 1시간 정치 후 -70℃ 초저온 냉동고에 보관하나 영구보관을 위해서는 -70℃에서 24시간 이상 보관 후 액체 질소 탱크로 이전하여 보관한다. 일단 보관된 세포주는 특별한 처리과정을 거치지 않아도 단순히 해동시킴으로써 다시 배양을 할 수 있으나 세포의 보관과 재배양시 가장 주의해야 할 점은 천천히 열리고 재빨리 녹이는 과정이 필수적이다. 세포주들은 각각의 세포주들 마다 세포은행을 확보하여야 한다. 즉 최초 세포를 분양받았을 때 가능한한 적은 계대수를 거치면서 가능한 많은 세포를 보관하여 낮은 계대수의 세포를 다량 확보하여야 한다. 액체질소로부터 복구하고자 하는 세포를 꺼내고 바이알 속의 액체질소가 기화된 후 (약 10초 소요) 37℃로 가열한 물에 즉시 녹인다. 즉시 녹인 세포 부유액으로부터 소량 (100 μ l)을 취하여 triphan blue로 염색한 후 복구된 세포의 생존율을 확인한다 (약 60% 이상). 세포 부유액 보다 10배 많은 양의 새로운 증식배지로 세포를 세척한 후 원심분리하여 침전물을 취하고 37℃로 가열한 증식배지 5 ml을 첨가한 후 25 cm 배양용기에 넣고 5% CO₂ 배양기에서 배양한다.

참고문헌

- 1) 김영균 외. 임상진균학. 제2판, 2000.
- 2) Gerhardt P. Manual of methods for general microbiology, Gherna RL. Preservation. ASM, 1981.
- 3) CABI Guidelines : Laboratory procedures for microorganisms, <http://www.cabri.org/guidelines/g1-framed.html>