

降温速率对溶液结晶的影响

李玉芳¹, 赵刚²

(1. 中国科学技术大学电子科学与技术系, 合肥市 230027)

(Tel: 0551-63601810, Email: zhaog@ustc.edu.cn)

摘要: 在常见的低温保存及冷冻过程中, 保护剂的种类和降温速率影响着最终的保存效果。本实验借助了现有的冷热台与低温显微镜条件, 研究了不同降温速率 (5、20、60 °C/min) 条件下不同溶液结晶温度的变化。通过一系列实验发现: 对于同一溶液, 随着降温速率的增大, 溶液的结晶温度会降低; 对于不同溶液, 降温过程中冰晶的形态也是各不相同, 生长尖端也是有些尖锐有些平缓。该实验结果表明溶液种类和降温速率对溶液的结晶温度以及冰晶形态存在一定的影响, 在以后的实验中, 应该针对不同的要求选用不同的保存溶液和降温速率以实现最好的效果。

关键词: 低温保存; 降温速率; 冰晶形态; 结晶温度

Effect of Cooling Rate on Crystallization of Solution

Li Yufang¹ Zhao Gang²

(1. Department of Electronic Science and Technology, University of Science and Technology of China, Hefei 230027)

Abstract In the common cold storage and freezing process, the type of protective agent and the cooling rate affect the final preservation effect. In this experiment, the crystallization temperatures of different solutions under different cooling rate (5, 20, 60 °C/min) were studied by using the existing hot and cold table and cryogenic microscope conditions. Through a series of experiments, it was found that for the same solution, as the cooling rate increases, the crystallization temperature of the solution will decrease; for different solutions, the morphology of the ice crystals during the cooling process is also different, and the growth tip is also somewhat sharp and somewhat flat. The experimental results show that the type of solution and the cooling rate have a certain influence on the crystallization temperature and the ice crystal form of the solution. In the subsequent experiments, different storage solutions and cooling rates should be chosen to achieve the best results for different requirements.

Keywords Cryopreservation Cooling rate Ice crystal form Crystallization temperature

0 前言

现代低温生物学中, 细胞、组织以及器官的低温保存占据着很重要的地位。目前, 已经成功实现了大量样本的低温保存, 例如, 红细胞、干细胞、胚胎、皮肤等^[1-3]。但是对于部分组织及器官, 保存的效果并不理想, 这主要是因为保护剂自身的毒性和在冷冻复温过程中产生的冰晶对细胞造成的机械损伤^[4]。为此, 如何选用合适的保护剂种类以减小整体保护剂的毒性和如何减小降温过程中的保存效果是低温中的重要疑难问题。

低温保护剂根据溶质分子大小主要可以分为渗透性和非渗透性。常见的渗透性保护剂有二甲亚砜 (DMSO)、乙二醇 (EG)、甘油等。这类保护剂的分子比较小, 能够通过细胞膜, 更快的实现细胞内外的渗透压平衡, 同时其可以与溶液中的水分子结合, 增加溶液的黏性, 从而达到弱化水的结晶的目的。非渗透性保护剂主要是一些糖类和聚合物大分子, 例如, 海藻糖、蔗糖、聚乙烯吡咯烷酮等。这类保护剂分子较大, 无法通过细胞膜, 但是其可以降低细胞外溶液的溶质浓度, 细胞内的水分子流出细胞, 从而减少胞内冰的形成^[5, 6]。这些保护剂广泛地应用于细胞、组织和器官的低温保存。例如, 通常情况下保存红细胞会选用甘油作为保护剂, 而实验冻存细胞则选用 DMSO, 这些不同的选择对应着不同的需求。为此我们需要知道不同保护剂各自的特点, 从而选取合适的保护剂。

本文使用装有冷热台的显微镜, 分别研究了四种不同溶液在不同降温速率下的结晶情况, 以溶液的结晶温度和冰晶形态作为标准, 比较不同溶液结晶的现象, 从而发现其各自的特性。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

1.1.1 实验试剂

本实验中的用到的试剂包括：去离子水、海藻糖、二甲亚砜（DMSO）和聚乙烯醇（PVA）。利用这些试剂，配制了不同浓度的溶液，主要有：10%（v/v）的 DMSO 溶液、1 mol/l 的海藻糖溶液和添加了 10 mg/ml PVA 的水溶液

1.1.2 实验装置

主要的实验装置如下图 1 所示。主要包括：Olympus BX53 光学显微镜、FDCS196 冷热台，液氮储存罐、温度控制器、Qingming MicroPublisher RTV CCD、计算机等。其中显微镜结合 CCD 可以实现实验的实时观察（分辨率：960×720，采集帧速率：5 帧/s），温度控制器的降/复温、保持时间精度可达±0.1 °C/min、±1 °C/min 和±1 s。样本腔在实验过程中会充满液氮气体以避免在实验过程中出现雾气影响实验观测。

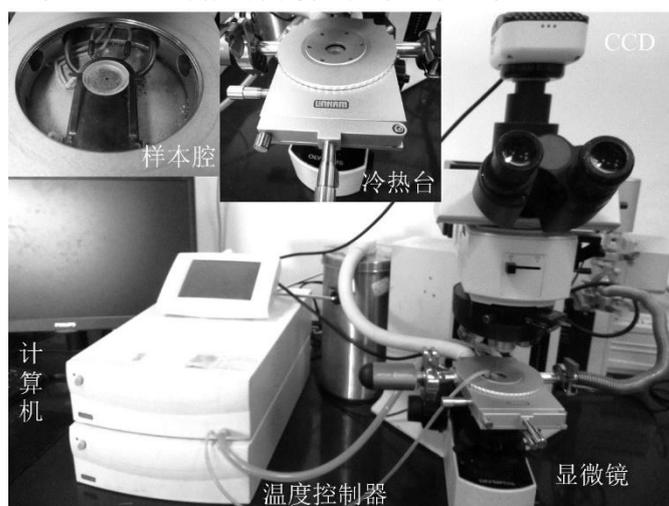


图 1 实验装置图

1.2 实验方法

实验之前配制好所需的所有溶液，每次实验过程中，利用移液枪吸取 5 μl 溶液滴至坩埚内的载玻片上，然后盖上盖玻片，关闭冷热台的盖子，并调整显微镜的焦距至合适的视野。利用温度控制软件设置相应的降温程序，即首先以 100 °C/min 的速率降至 4 °C 并在此温度保持 1 min，然后以不同的降温速率降至 -120 °C，保持 2 min，最后以统一的复温速率 60 °C/min 升至 25 °C。

2 结果

2.1 降温速率对溶液结晶初始温度的影响

使用去离子水、1 mol/l 海藻糖、1 mol/l 海藻糖+10 mg/ml PVA 和 10% DMSO 四种溶液研究了降温速率对溶液结晶温度的影响，采用的降温速率为 5、20 和 60 °C/min，结果如表 1 所示。

表 1 不同溶液在不同降温速率下的结晶温度

结晶温度 降温速率	water	10%(v/v) DMSO	1mol/l 海藻糖	1 mol/l 海藻糖+10 mg/ml PVA
5 °C/min	-14.1	-13.10	-14.55	-14.2
20 °C/min	-17.0	-19.30	-19.8	-17.5
60 °C/min	-19.2	-20.40	-27.23	-20.3

由表可知，对于四种溶液来说，随着降温速率的降低，溶液的结晶温度均呈现上升趋势。这一现象是

由于随着降温速率的变大，溶液中粒子受到的惯性越大，从而导致其结晶温度下降^[7, 8]。

对于不同的溶液，可以看出其结晶的初始温度也大不相同，其中 10% (v/v) DMSO 作为常见的慢速冷冻低温保护剂，其结晶的初始温度在慢速降温时与水相差较多，但是，随着降温速率的升高，其结晶初始温度与水的相接近。这一现象说明 10% (v/v) DMSO 在慢速降温时可以降低溶液的结晶温度，起到保护细胞的作用。由图 2(C)可知，海藻糖溶液的结晶初始温度相对于其他溶液来说降低，说明可以在低温保存保护剂中加入一些海藻糖溶液，从而降低细胞外溶液的结晶温度，起到保护细胞的作用。在海藻糖的基础上加入了一些 PVA 溶液，伴随着 PVA 的加入，溶液的结晶初始温度升高至 DMSO 的水平，说明 PVA 具有促进冰晶成核的作用，这对于一些冷疗等方向具有一定的参考价值。

2.2 降温速率对溶液冰晶形态的影响

图 2 是四种不同溶液在不同降温速率下的结晶现象。其中 A 表示的去离子水，B 表示的是 10% (v/v) DMSO 溶液，C 表示的是 1 mol/l 的海藻糖溶液，D 则是 1 mol/l 海藻糖+10 mg/ml PVA 溶液。

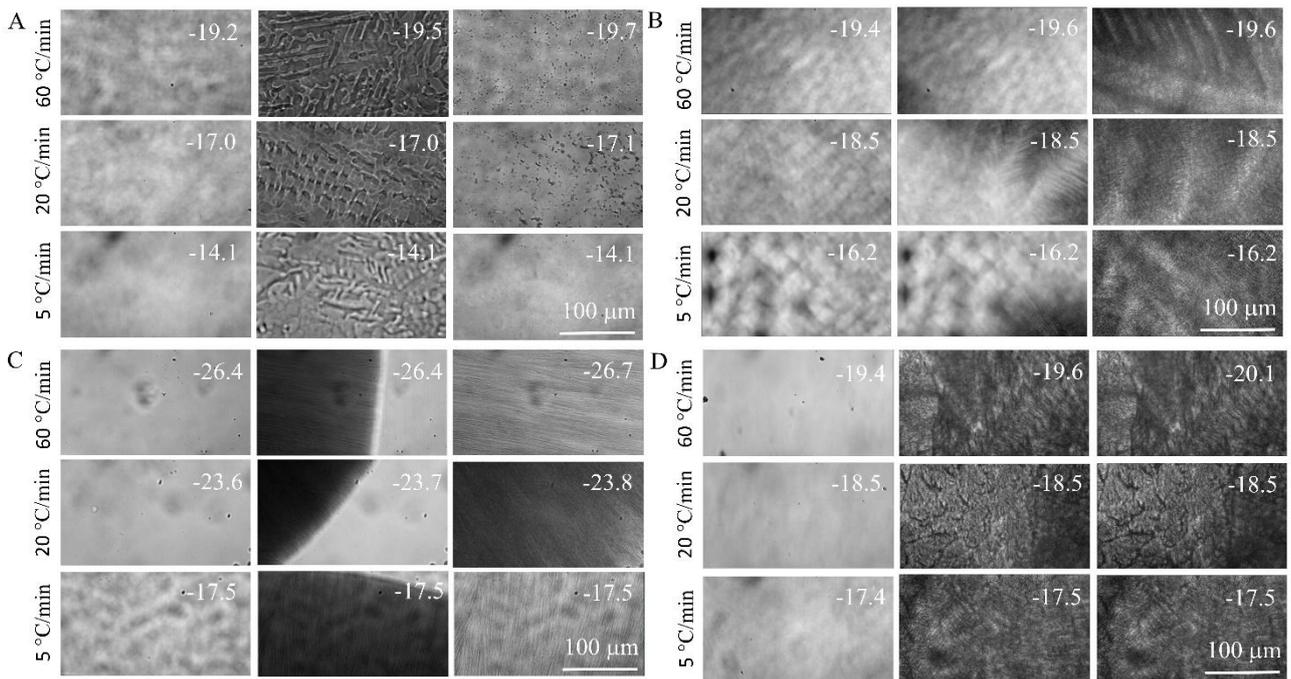


图 2 四种不同溶液在不同降温速率下的结晶现象

由图 2 可知，不同溶液的结晶的冰晶形态具有很大的差异。去离子水形成的冰晶具有栅格形态，各个方向的冰晶形成较为均匀；DMSO 形成的冰晶具有很尖锐的形状，这种冰晶对于细胞的损伤较大，会扎破细胞膜，引起细胞破裂以至死亡^[9]；海藻糖溶液形成的冰晶前端十分平缓，对于细胞来说，这种冰晶没有较多的棱角，减少了细胞的损伤；加入 PVA 分子之后的海藻糖溶液形成了层状的冰晶，这类的冰晶没有尖锐的前端，生长也呈现平面状，在垂直方向变化不大。但是另一方面，降温速率的变化对于冰晶的形态来说并没有产生太大的影响。由图 B 可以看出，随着降温速率的降低，其冰晶前端变得更加尖锐，即在细胞冷冻保存时更容易刺穿细胞膜，致使细胞死亡。

3 结论

通过一系列的实验研究表明，降温速率对于溶液的结晶具有一定的影响，这一影响包括两个方面：结晶的初始温度和冰晶形态。随着降温速率的升高，溶液的结晶初始温度会下降，因此，假设降温速率达到一定大小时，溶液的过冷度可以低于其固有结晶温度，从而避免降温过程中的冰晶损伤，实现更好的保存。另一方面，降温速率对于冰晶形态的具有较小的影响。

同时，通过对四种不同溶液的冰晶形态的比较可以看出，海藻糖是一种优良的细胞低温保护剂，其不但可以降低溶液的结晶温度，同时其形成的冰晶的前端十分平缓，这可以大大减少冰晶对细胞的损伤。添加了 PVA 溶液的结晶温度虽然上升，但是其冰晶形态十分平缓且呈现层状，这对于细胞保存来说，可以大幅度降低细胞尖端对细胞膜的损伤，提高保存后的细胞存活率。

本实验研究了几种溶液结晶现象，并基于此得出了一系列规律，但由于只测量有限的样本，结论的正确性和适用性还需要用后续的更多的实验来加以验证。

参考文献:

- [1] Ambrosini G., Andrisani A., Porcu E., et al. Oocytes cryopreservation: state of art [J]. *Reproductive Toxicology*, 2006, 22(2): 250-62.
- [2] Stefanic M., Ward K., Tawfik H., et al. Apatite nanoparticles strongly improve red blood cell cryopreservation by mediating trehalose delivery via enhanced membrane permeation [J]. *Biomaterials*, 2017, 140(138).
- [3] Yong K. W., Wan S. W., Xu F., et al. Cryopreservation of Human Mesenchymal Stem Cells for Clinical Applications: Current Methods and Challenges [J]. *Biopreservation & Biobanking*, 2015, 13(4): 231.
- [4] Mazur P. A two-factor hypothesis of freezing injury [J]. *Experimental Cell Research*, 1972, 71(1): 495-510.
- [5] Crowe L. M., Crowe J. H., Rudolph A., et al. Preservation of freeze-dried liposomes by trehalose [J]. *Archives of Biochemistry & Biophysics*, 1985, 242(1): 240-7.
- [6] Rossi S., Buera M. P., Moreno S., et al. Stabilization of the restriction enzyme EcoRI dried with trehalose and other selected glass-forming solutes [J]. *Biotechnol Progr*, 1997, 13(5): 609-16.
- [7] 李维杰, 周新丽, 刘宝林, et al. 升降温速率对低温保护剂溶液结晶性质的影响 [J]. *化工学报*, 2013, 64(8): 2969-74.
- [8] 陈芳, 赵学增, 王伟杰. 聚合物中纳米粒子气泡膨胀分散方法 [J]. *化工学报*, 2008, 59(3): 766-72.
- [9] 吴宏伟, 陶冶, 高平, et al. Ice Crystal Sizes and Their Impact on Microwave Assisted Freeze Drying [J]. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 2004, 12(6): 831-5.