



生物样本库建设中的低温生物学

胥义^{1,2†*}, 郭宁^{1,2†}, 杨国梁^{1,2}, 占太杰^{1,2}, 韩恒鑫^{1,2}, 程跃³, 赵刚^{4*}, 魏强^{5*}, 周学迅^{6*}, 刘宝林^{1,2*}

1. 上海理工大学生物系统热科学研究所, 上海 200093;
2. 上海市生物资源低温保存技术服务平台, 上海 200093;
3. 安徽医科大学生物医学工程系, 合肥 230032;
4. 中国科学技术大学电子工程与信息科学系, 合肥 230027;
5. 中国疾病预防控制中心国家病原微生物资源库, 北京 102206;
6. 中国医药生物技术协会组织生物样本库分会低温生物学组, 上海 200093

† 同等贡献

* 联系人, E-mail: xuyi@usst.edu.cn; zhaog@ustc.edu.cn; weiqiang@chinacdc.cn; zhou@biobanker.net; bliiuk@usst.edu.cn

收稿日期: 2022-07-25; 接受日期: 2022-09-26; 网络版发表日期: 2023-02-15

国家自然科学基金(批准号: 52076140, 51576132, 82172114, 51776130)和国家传染病防治科技重大专项(批准号: 2018ZX10734404)资助

摘要 生物样本库作为精准医疗、动植物优良育种以及生物安全的重要基石, 已经取得了长足进步, 但高质量生物样本库建设的需求愈发迫切。低温是实现活性生物样本高质量保存的重要手段, 而低温生物学在生物样本活库建设应用中仍面临着诸多挑战, 例如多层级低温损伤机制、低毒绿色低温保护剂开发、玻璃化保存工艺优化、复温损伤避免以及自动化低温存储技术等。这就亟需临床医学、细胞生物学、动植物学、微生物学与低温生物学等多学科融合来突破现有瓶颈, 为生物样本资源的高质量保藏和应用提供重要保障。

关键词 生物样本库, 低温生物学, 低温保存, 低温损伤

近年来, 随着我国生命科学领域的迅猛发展, 生物资源受到高度重视, 高质量的生物样本库建设需求也愈发增多。国家相继出台了《中华人民共和国人类遗传资源管理条例》(2019年)、《中华人民共和国生物安全法》(2021年), 对人类遗传资源和生物安全提出了规范要求, 为我国生物样本资源的保护与开发利用提供了法律保障。中国建设生物样本库从1994年中国医学科学院等机构建立中华民族永生细胞库开始^[1], 在近几年快速增长, 截至2022年4月, 已获中国人类遗传资源管理办公室批准保藏资质的生物样本库共有

225家(<https://fuwu.most.gov.cn/html/jgcx/>), 为促进我国生命科学基础研究、临床精准医疗以及生物安全发挥了重要作用。

现阶段, 我国生物样本资源库建设已经由“数量”需求转变为“质量”需求^[2-4], 特别是随着临床疾病样本从基因组学转向多组学研究, 基因治疗、细胞治疗等生物新技术逐渐走向临床应用, 样本使用者对长期保存样本原始特征的生物样本库提出了更高要求^[5-7], 越来越多的学者也提出要更加开创性地支持建设高质量的生物样本“活”库, 以促进精准医疗等领域的快速

引用格式: 胥义, 郭宁, 杨国梁, 等. 生物样本库建设中的低温生物学. 中国科学: 生命科学, 2023, 53: 1021–1034

Xu Y, Guo N, Yang G L, et al. Cryobiology for biobanking (in Chinese). Sci Sin Vitae, 2023, 53: 1021–1034, doi: 10.1360/SSV-2022-0171

发展^[8]。

实践表明, 以低温生物学为基础的冷冻保存技术是实现生物活体样本高质量长期保存的主要技术手段, 在细胞治疗^[9-11]、组织工程^[12,13]、辅助生殖^[14,15]、疫苗存储^[16]和器官储运^[17]等领域中已开展多年应用研究。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》中也明确了“积极发展低温生物学等保存技术, 提升资源长期保存能力”, 这必将进一步促进我国低温生物学应用于生物样本库建设。但是, 低温生物学领域尚面临着诸多挑战, 诸如分子层级的低温损伤机制、低毒有效低温保护剂的开发、大尺度组织器官的保存以及避免传统复温方法损伤等^[18]。鉴于此, 本文综述了我国生物样本库建设概况以及低温生物学的技术应用及面临的挑战, 为我国全面建设高质量生物样本库、保护生物资源提供参考技术路径。

1 我国生物样本库建设概况

在过去的十几年, 我国是全球生物样本库建设速度最快的国家, 图1展示了1994年至今我国生物样本库发展历程中的若干重要事件^[19,20]。不难看出, 我国的生物样本库建设正逐渐走向标准化、规范化, 能够更合理、有效地保存高质量的样本, 同时满足转化研究的要求^[6,21]。

生物样本主要包括人类与动物的组织、血液和其他体液以及各种衍生物、植物或种子、原核和真核细胞或分离的生物分子等, 是开展基础研究、转化研究以及临床研究的重要原材料^[22], 也是国家可持续发展的战略资源和国家生物安全的重要组成部分^[23]。根据生物样本的种类, 生物样本库可以分为人类样本库、动植物样本库和微生物样本库等, 具体见表1所示。人类样本库^[24,25]主要包括临床疾病样本库和以人群为基础的生物样本库, 用于疾病发病机制研究和治疗策略制定、研究疾病病因及预测未来发展^[26,27]。动植物样本库^[28]通过建设生物多样性基地和实体生物资源库来储存动植物样本及相关数据, 实现动植物优良育种、生物多样性保护等。微生物样本主要包括细菌、真菌、病毒等, 有效保存模式菌种和具有重要应用价值的菌种资源, 实现微生物资源可持续利用, 保障国家生物安全^[29-31]。

从表1可以看出, 生物样本的种类繁多、保存方式多样。动植物常采用就地保存或异地活体繁殖保存, 但这种方式受限于空间和环境, 无法保存足够的样本^[32]。而对于人类组织细胞、动植物种质资源以及微生物样本等, 主要采用低温保存方式为主, 以期实现对这些样本活性和功能的保存。有研究表明, 部分微生物样本通过冷冻干燥的方式可以实现非低温环境下的长期储存^[33], 但大部分活性生物样本的保存还面临着很大挑战^[34]。总体来讲, 尽管生物样本库领域对低温保存方

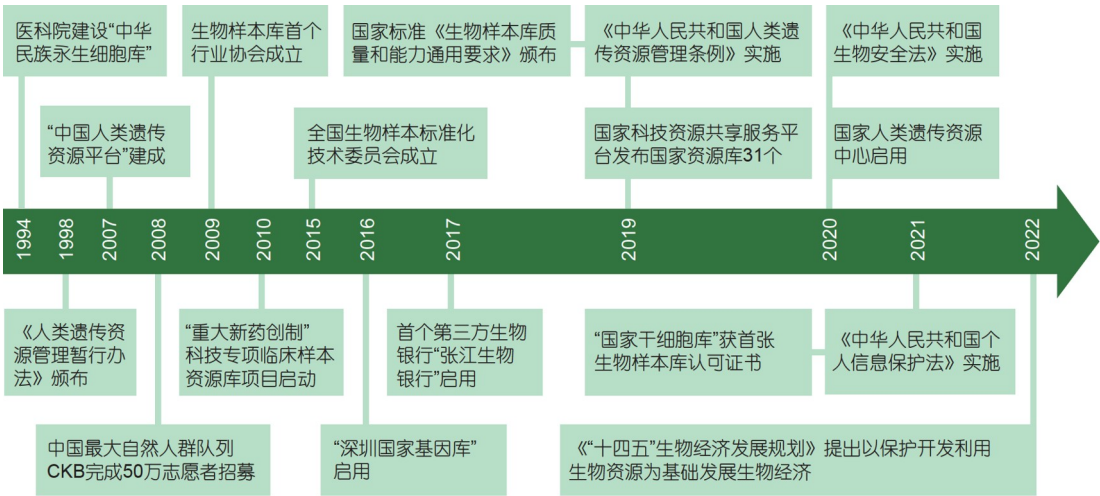


图1 我国生物样本库建设历程中的相关重要事件(网络版彩图)

Figure 1 Relevant important events in the construction of biobanking in China (Color online)

表 1 主要生物样本库种类
Table 1 Biobanks for multiple species

样本库分类	主要样本	保存条件	参考网址
人类样本库	血液(全血、血清、血浆、全血细胞、红细胞、白细胞、血小板)、组织、粪便、尿液、干细胞、生殖细胞、粪便微生物、口腔微生物等	液氮保存、程控降温、冻存组织、冰冻切片、石蜡切片	https://www.egene.org.cn/cms/g-index.jhtml http://zjubrainbank.zju.edu.cn/
植物样本库	种子、DNA、离体培养物、活体植株、作物种质、瓜果蔬菜、林草花竹藤	植株: 原地保存、异地保存; 种子: 密封干燥, 低温保存	https://seed.iflora.cn/ http://www.nhgri.cn/pcindex/ http://ctcgri.catas.cn/ http://www.nfgrp.cn/
动物样本库	家养动物、水生生物、海洋水产、淡水水产、部分寄生虫、鼠和兔等实验动物、非人灵长类实验动物、禽类实验动物、犬类实验动物、遗传工程小鼠、人类疾病动物模型	原地保存、迁地保存、活体动物繁殖、冷冻保存动物生殖细胞和胚胎等	http://nhp.kiz.ac.cn/ http://pla.caas.cn/web/index.html https://www.tdrc.org.cn/ http://freshwater.fishinfo.cn/ http://www.nabrc.org.cn/ http://www.nfgrp.cn/
微生物样本库	细菌、真菌、病毒等	深低温冻结法、冷冻干燥法、矿物油保藏法、沙土管保藏法以及斜面转接法等	http://www.nimr.org.cn/ http://www.nprc.org.cn/
其他样本库	干细胞及分化的多种功能细胞资源、实验细胞资源	-70℃冰箱冷冻或程序降温盒慢速冷冻, 后移到液氮中保存; 液氮保存	https://nsctrc.tongji.edu.cn/index.html http://www.bjscb.cn/dms/ http://www.cellresource.cn/

式寄予厚望, 但仍然存在对具体样本的低温生物学效应研究和低温保存工艺探索严重不足的问题, 从而导致生物样本质量有待提高、利用率普遍不足等情况。这亟需临床医学、细胞生物学、动植物学、微生物学与低温生物工程学等多学科融合来突破现有瓶颈, 为我国生物样本资源的高质量保藏和应用提供重要保障。

2 生物样本库建设中低温生物学的发展及挑战

从发展历史来看, 低温生物学(Cryobiology)是生物科学的一门分科, 是研究0℃以下或接近0℃的低温环境下生命现象的科学, 广泛应用于自然状态下生物耐寒性以及种质资源的保存等^[35]。而随着现代制冷技术和生命科学技术的快速发展, 低温技术在人类同疾病作斗争中逐渐发挥重要作用, 尤其是在以人体重要细胞、组织和器官低温保存的生物样本库建设中成为不可或缺的重要手段, 这也赋予了低温生物学新的发展内涵, 见图2。

大量的实践已经证实, 生物样本在采集、运输、

存储等环节中均需要严格控制低温环境, 以确保样本质量得到保护^[39]。生物样本在经历低温冷冻、存储和复温过程中, 会发生极为复杂的冻结固化、复温融化以及小分子物质迁移渗透等物理现象和相应的生物学效应, 这都可能会导致生物样本经氧化应激损伤、溶液损伤、冰晶损伤以及热应力损伤等。如何深入刻画这些损伤机制以及削弱或规避这些损伤的影响, 一直是低温生物学者们努力探索的重点, 但这一过程又面临着诸多挑战。

2.1 低温损伤机理还有待深入探讨

在低温生物学的发展历程中, 冰晶损伤一直备受关注, 这是因为生物样本中液态物质冻结到固态, 冰晶的形成是不可避免的, 其中冰晶成核、生长和再生长都会对低温保存效果产生显著影响。1972年, Mazur等人^[40]提出了著名的“两因素假说”, 认为细胞降温过程会同时经历溶液损伤和胞内冰损伤, 可以找到一个相对合适的最佳降温速率。事实上, 降温冻结过程中的溶液损伤主要是由于慢速降温时细胞外冰晶形成而导致的渗透损伤, 其形成机制是显而易见的。但快速降温形成胞内冰的机制至今没有定论, 主要有孔隙理

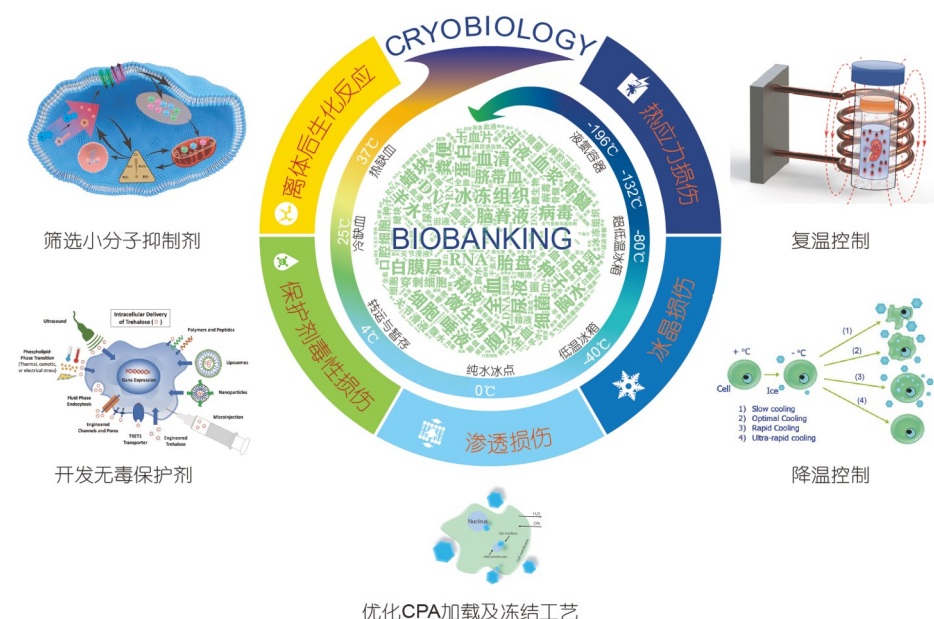


图 2 生物样本库中的低温生物学. 筛选小分子抑制剂, 开发无毒保护剂^[36], 优化CPA加载及冻结工艺, 降温控制^[37], 复温控制^[38]

Figure 2 Cryobiology for biobanking. Screening small molecule inhibitors, developing nontoxic protective agents^[36], optimizing CPA loading and freezing processes, cooling control^[37], rewarming control^[38]

论^[41]、表面催化成核(surface catalyzed nucleation, SCN)理论^[42]、体积催化核化(volumn catalyzed nucleation, VCN)理论^[42]和细胞膜损伤理论^[43]等四个方面。因此, 冰晶调控对于最大限度地减少样本损伤至关重要^[44], 诸多学者围绕新型化学控冰材料开发^[45]、创新低温保护剂递送策略^[36]以及外加物理场^[46]等多方面调控冰晶进行了较为系统的实验研究, 的确达到了减小冰晶对生物样本损伤的目的^[47]。但是, 如何更加深刻、科学地认识低温冰晶损伤及抑制机制^[48], 仍然是一个值得深入探讨的关键问题。

近些年, 低温损伤机制的研究已经进入了分子水平, 主要体现在两个方面: 一是低温氧化应激损伤机制, 认为细胞在冷冻及复温过程中因ATP合成不足和活性氧(reactive oxygen species, ROS)的大量产生导致代谢和氧化还原失衡进而造成了细胞损伤^[49], 可以通过添加抗氧化剂^[50]、金属离子螯合剂^[51]等来平衡细胞抗氧化防御系统, 调节细胞ATP水平等途径来减轻低温保存过程中的样本损伤; 二是低温保护剂毒性损伤分子机制, 发现部分高浓度低温保护剂可能导致线粒体功能损伤、脱氧核糖核酸(DNA)和蛋白质等大分子及组织的超微结构破坏等, 使得细胞的增殖和分化

能力减弱甚至死亡^[52]。总体来讲, 低温损伤分子机制研究还处于起步阶段, 研究的样本种类还比较有限, 仍需进一步评估分子层级的氧化应激损伤和各类保护剂毒性损伤, 才有利于指导开发低毒有效的低温保护剂方案。

2.2 亟需开发低毒有效的低温保护剂

1949年,甘油首先被发现能够实现公牛精子的低温保存,低温保护剂的发展及研究一直备受关注^[47,53]。传统低温保护剂根据分子量大小一般可以分为渗透型和非渗透型^[54],渗透型保护剂可以透过细胞膜进入细胞,与水分子发生水合作用,增加胞内溶液黏度,弱化了结晶过程;非渗透型保护剂主要作用于细胞外,调节细胞内外渗透压,降低冷冻损伤。通常渗透型和非渗透型保护剂复合配方更有利于生物样本的低温保存效果,在实际应用中,常常采用“鸡尾酒”式的复合保护剂方案,可以获得更好的低温保存效果^[55]。

近年来,已有报道表明某些低温保护剂虽然具有良好的抑冰效果,但也会对生物样本的活性和功能带来一定的毒性^[56],尤其是对生物样本分子层级的损伤是不可逆的。例如,二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide,

DMSO)作为最常用的低温保护剂, 会改变蛋白质二级结构, 减少膜脂中的胆固醇酯并影响其氧化状态^[57], 同时还可能诱导细胞骨架变化、染色质变化及诱导细胞分化等问题^[58], 为样本的临床应用带来很大挑战. 特别是细胞治疗中CAR-NK和CAR-T这种对冷冻和复温敏感的异质细胞群, 目前已经尝试使用糖类、聚合物和氨基酸类等新物质进行保存并开发了显微注射等一系列保护剂递送技术, 然而替换DMSO冷冻保存CAR-NK和CAR-T细胞还处于起步阶段, 仍面临很多困难^[10]. 因此, 领域内对“去DMSO(DMSO-free)”的呼声越来越高, 开发绿色无毒的低温保护剂就显得至关重要.

根据文献调研, 目前围绕绿色新型低温保护剂开展的研究主要从两个方面进行: 一是筛选自然界中的天然抗冻物质, 例如抗冻蛋白、海藻糖和脯氨酸等; 二是基于仿生机理开发的新型抑冰材料, 例如合成聚合物、纳米材料及水凝胶等. 主要新型保护剂种类如

表2^[36,45,59-86]所示. 虽然, 天然保护剂具有良好的生物相容性, 但存在提取过程复杂、成本高等问题. 因此, 仿生材料的研究在近些年得到了快速发展, 尤其在设计和合成复杂结构及官能团方面取得了较大进展^[47]. 但是在临床应用之前, 仍需探索新型保护剂对膜完整性、表观遗传学、细胞代谢和蛋白质组学的影响, 以便更安全广泛地推广使用.

2.3 优化降温冷冻方法是削弱冰晶损伤的关键

如何避免或削弱降温过程的冰晶损伤, 一直是生物样本优化降温控制方法的研究重点. 从传热学角度来看, 样本封装尺寸越大, 其传热控制越困难, 其遭受的冰晶损伤程度也越大. 在生物样品降温冷冻方法中, 一般采用慢速冷冻或两步冷冻法, 达到现有冷冻技术和保护效果最佳结合点, 但仍然避免不了一定程度的冰晶损伤. 而玻璃化保存可以有效避免冰晶损伤, 被认为是最佳低温保存方法, 一般都需要很快的降温速

表 2 新型低温保护剂
Table 2 New types of cryoprotectants

保护剂种类	主要物质	主要保护机制	样本名称	参考文献
抗冻蛋白	主要包括自然界中的细菌、昆虫、鱼类和植物等耐寒生物的提取物以及人工合成物	吸附于冰晶表面, 抑制冰重结晶	小鼠卵巢组织、人类红细胞、猪卵母细胞	[59-62]
糖类	主要包括自然界中的低等生物体和动植物提取物及人工合成, 例如单糖、二糖、多糖等	水合作用或代替水与磷脂膜相互作用	哺乳动物细胞、红细胞、血小板、干细胞、胚胎、胰岛、生殖细胞、微生物	[36,63]
氨基酸类	主要包括微生物和植物提取物以及人工合成, 例如脯氨酸、赖氨酸等	调节渗透压、减少渗透损伤, 与水分子形成氢键, 抑制冰晶形成	Hela细胞、GLC-82细胞、平滑肌细胞、红细胞、精子	[64-66]
两性离子	主要包括微生物和动植物体内的小分子提取物以及人工合成, 例如甜菜碱、左旋肉碱等	平衡细胞内外渗透压, 并通过水合作用抑制冰晶形成和生长	软骨细胞、GLC-82细胞、Hela细胞、MCF-10细胞	[67,68]
纳米抑冰剂	主要包括氧化石墨烯GO、氮化碳量子点OQCNS、锆基金属有机骨架MOF等	与冰晶格匹配, 修饰冰晶表面并抑制冰重结晶	红细胞、马精子、心脏、肾脏	[69-76]
合成聚合物	主要包括聚乙烯醇、聚两性电解质、聚脯氨酸等	通过氢键吸附冰晶表面, 与水作用, 抑制冰晶生长	蛋白质、红细胞、猪胚胎、小鼠卵母细胞、大鼠胰岛、人真皮成纤维细胞、自然杀伤细胞(NK)、干细胞	[66,77-80]
水凝胶	主要包括天然海藻酸盐水凝胶、聚两性水凝胶等	三维网络结构抑制冰核化, 防止冰传播, 减少冰黏附	人干细胞、小鼠胚胎干细胞、小鼠成纤维细胞、益生菌、胰岛、卵泡	[45,81-83]
天然低共熔体	主要包括有机酸、糖、氨基酸和胆碱类似物等两种或多种初级代谢化合物按一定比例混合的物质, 例如海藻糖:甘油、脯氨酸:葡萄糖等	大量氢键抑制水分子运动, 改变水的冻结行为	表皮细胞、癌细胞、酵母菌、乳酸菌	[84-86]

率才能实现^[35]。玻璃化保存的理论最早由Luyet^[87]在1937年提出, Rall和Fahy^[88]在20世纪80年代推动了玻璃化保存方法在生物样本中的应用。目前, 玻璃化保存主要有两类研究: 一类针对大尺寸复杂生物组织样本, 降温速率慢, 主要采用高浓度低温保护剂方法来避免冰晶损伤, 可以实现对样本组织结构完整性的保护, 但该方法会造成样本生物学功能的不可逆损伤, 目前尚未有理想解决方法, 亟需创新研究方法深入探索^[89~91]; 另一类研究针对小尺寸生物样本, 主要采用低浓度保护剂和超快速降温组合的方式实现玻璃化, 在减少低温保护剂造成的溶质损伤情况下, 尽量避免冻结过程中因冰晶产生的机械损伤。常见的降温方法及降温效果见表3所归纳^[38,92~110]。

从表3可以看出, 商业化的小尺寸样品玻璃化保存载体主要包括开口式拉长麦管、冷冻环、冷冻帽、石英微毛细管、Cryotop、Cryoloop等^[111], 这些方法存在保护剂使用浓度较高、过度依赖操作经验等问题。近

年来出现了微流体封装微滴玻璃化保存^[112]、生物微滴打印玻璃化保存^[100]、皮升级无保护剂微滴超快速冷冻玻璃化保存^[101]等新技术, 可以实现低浓度保护剂、超快速降温玻璃化保存。尤其是随着现代自动化控制技术的发展, 此类技术极有可能实现高通量、自动化等功能, 但如何克服微滴封装生物样本在液氮冷媒中的逆Leidenfrost效应, 确保微小尺寸生物样本快速降温玻璃化保存, 仍然是值得探讨的一个关键问题^[113~116]。

2.4 优化复温方法是避免复温损伤的关键

复温损伤一直是冷冻生物样品面临的另一个关键问题, 如何避免复温损伤是研究者们一直关注的重点^[117]。常见的复温损伤主要包括冰晶再生长损伤^[118,119]和机械热应力破坏^[120]等两种方式。对于小尺寸样品, 主要存在冰晶再生长损伤, 可以通过提高复温速率来避免; 而对于大尺寸样品, 除了冰晶再生长

表 3 常用降温方法及降温效果

Table 3 Cooling methods and effects

封装尺寸	封装方式	样本体积	降温速率	样本名称	优缺点	参考文献
微米级	传统麦管	250 μ L	2500 $^{\circ}$ C/min	小鼠胚胎	优点: 降温速率快 缺点: 依赖操作经验、易污染	[92]
	开口式拉长麦管	$\sim$ 1 μ L	20000 $^{\circ}$ C/min	牛胚胎		[93]
	电镜铜网	< 1 μ L	150000 $^{\circ}$ C/min	牛卵母细胞		[94]
	Cryoloop	<1 μ L	700000 $^{\circ}$ C/min	人类胚胎		[95]
	Cryotop	<0.1 μ L	23000 $^{\circ}$ C/min	人类胚胎		[96]
	Cryotip	$\sim$ 1 μ L	12000 $^{\circ}$ C/min	人卵母细胞和胚胎		[97]
	石英毛细管	$\sim$ 1 μ L	250000 $^{\circ}$ C/min	鼠胚胎干细胞		[98]
	常规微液滴法	1 $\sim$ 10 μ L	1100 $\sim$ 17500 $^{\circ}$ C/min	干细胞	优点: 降温速率极快 缺点: 设备要求高、易污染、易蒸发	[99,100]
	喷墨液滴法	40 $\sim$ 200 pL	432000 $\sim$ 2220000 $^{\circ}$ C/min	哺乳动物细胞		[101,102]
毫米级	冻存管	$\sim$ 1 mL	约 -1° C/min	造血干细胞	优点: 方法成熟、成本较低 缺点: 降温速率慢、容易结晶损伤	[103]
	冻存管	$\sim$ 1 mL	约 -0.25° C/min	大鼠胰岛		[104]
	冻存管	$\sim$ 2 mL	$\sim$ 212.09 $^{\circ}$ C/min	脐带血管		[105]
	冻存管	$\sim$ 5 mL	先以 -1° C/min至 -40° C 和 -3° C/min至 -120° C	人角膜		[106]
	冻存袋	$\sim$ 10 mL	0.69 $^{\circ}$ C/min	兔颈动脉		[107]
厘米级	冻存袋	$\sim$ 25 mL	以 -40° C/min从4 $^{\circ}$ C降至 -121° C, 退火25 min; 然后以 -10° C/min降至 -151° C	大鼠肾脏	优点: 样本容量大, 可以实现大体积样本冻存, 有利于临床转化 缺点: 降温速率慢, 对于大体积生物样本存在热应力损失问题	[108]
	套管式冻存管	$\sim$ 5 mL	约 -5° C/min	大鼠肾脏		[38]
	冻存管	$\sim$ 20 mL	-15° C/min	大鼠心脏		[109]
	冻存袋	$\sim$ 2 mL	-0.5° C/min	大鼠后肢		[110]

损伤, 机械热应力损伤也是不可避免的, 这不仅需要足够快的复温速率, 同时还要确保样本内部温度分布的均匀性. 研究者们围绕上述问题, 在传统水浴复温的基础上, 陆续进行了微波复温^[121,122]、激光复温^[123,124]、磁热复温^[125,126]等方法的研究, 取得了较大进展, 具体见表4所归纳^[38,108,109,124,125,127~134].

微波复温早在19世纪70年代就被用于复温冷冻保存的犬肾^[121], 但由于趋肤效应(skin effects)、场强衰减快、生物材料介电常数随温度变化等诸多影响因素, 尚不能应用于大型复杂组织或器官的均匀加热^[135~137]. Jin和Mazur^[123]首先利用激光复温玻璃化冷冻卵母细胞, 复温速率达到 10^7 °C/min, 显著提高了冷冻卵母细胞复温后的存活率. 后续研究表明, 添加合适的纳米粒子有助于强化激光复温效果^[46,132,138], 证明了激光加热方式在小尺寸样品快速复温中具有很大的

优势. Zhao团队^[133]将磁热复温引入至低温保存, 实现了冻存干细胞的超快速均匀复温, 极大降低了对毒副性化学试剂的需求(从8 mol/L降低到4 mol/L). 基于此, 还进一步发展了光-磁双热效应复温技术, 将近红外激光引入电磁场中(两场互不干扰), 在不需要进一步提高电磁场场强的前提下, 解决了复温速率提升的瓶颈问题, 实现了比同样条件下单一电磁场复温方式更快的超快速复温^[138].

针对大尺寸冷冻生物样品, 磁热复温方法因具有穿透性强、升温速率快且加热均匀等优势而被寄予厚望^[139]. Bischof团队^[125]首先利用低频交变磁场激励磁纳米粒子快速产热, 成功实现了玻璃化保存猪颈动脉的高质量复温; Xu团队^[38]通过该方法复温玻璃化保存大鼠肾脏, 获得了良好的血管网络结构, 该工作与Sharma等人^[108]和Chiu-Lam等人^[109]共同验证了磁热复

表 4 新型复温方法及复温效果

Table 4 New rewarming methods and effects

复温方法	样本名称	封装方式	复温速率	调控参数	保存效果	优缺点	参考文献
微波复温	CPA溶液	圆柱形样品架 (20 mL)	43°C/min	430 MHz	样本内温度梯度显著降低		[127]
	Jurkat细胞	圆柱形样品架 (25 mL)	90°C/min	434 MHz	回收率比水浴法高出 63.1%	优点: 提高复温速率 缺点: 存在“热失控”现象、温度不均匀	[128]
	人肾模型	圆柱形容器 (90 mm×127 mm)	先<2°C/min, 后>100°C/min	108 MHz	样本内温度梯度较小		[129]
光热复温	小鼠卵母细胞	Cryotop(0.1 µL)	10^7 °C/min	1064 nm 激光	存活率达到96%		[130]
	斑马鱼胚胎	半圆微液滴 (1 µL)	1.4×10^7 °C/min	1064 nm 激光	显著提高了复温后的存活率	优点: 复温速率极快, 大大降低保护剂使用浓度	[131]
	人骨髓来源的间充质干细胞	麦管(50 µL)	>1400°C/min	808 nm近红外激光 (1 W/cm)	存活率达到78%	缺点: 激光穿透力弱, 仅适用于小体积样本	[132]
	人脐静脉内皮细胞	麦管(150 µL)	~50000°C/min	808 nm激光 (5 W/cm)	存活率超过70%		[124]
磁热复温	成纤维细胞、猪血管、猪心瓣膜	冻存管 (1~80 mL)	>130°C/min	360 kHz, 20 kA/m	结构和功能得到了更好保护		[125]
	hUCM-MSCs	麦管(200 µL)	>1400°C/min	375 kHz, 10 s和 0.05%(w/v) Fe ₃ O ₄	细胞存活率为 71.7%、保留干细胞功能	优点: 显著提高复温的速率和温度场均匀性、可用于大尺寸样本复温	[133]
	猪动脉	冻存管(厚 0.2 cm, 长1 cm)	2000°C/min	360 kHz, 20 kA/m 和 30 kA/m	复温后的血管结构良好, 细胞活力≥90%	缺点: 存在磁纳米粒子分布不均匀及残留毒性的风险	[134]
	大鼠心脏	冻存管(~1 cm)	321°C/min	278 kHz, 42.5 kA/m	组织结构保存良好, 没有宏观损伤		[109]
	大鼠肾脏	冻存袋(~2 cm)	63.7°C/min	180 kHz, 63 kA/m	组织结构保存良好		[108]
	大鼠肾脏	冻存管(~2 cm)	100°C/min	765.2 kHz, 24.2 kA/m	血管网络结构保存较好		[38]

温在避免冷冻组织器官复温损伤方面具有一定的优势. 目前仍有诸多关键科学问题需要深入探索, 例如使用毒性小的玻璃化溶液, 开发稳定性好、热转化效率高的纳米粒子以及探索均匀灌注与洗脱方法等.

2.5 尚需加强自动化存储新技术与低温生物学的交叉融合

随着我国生物样本库建设的蓬勃发展, 生物样本存储数量也越来越多, 其中很多关键步骤亟需自动化和标准化处理, 来避免手工方式带来的效率低、存储质量难以得到保证等问题^[140]. 近年来我国工业领域自动化技术日趋成熟, 可以对生物样本库的规范化、标准化的高质量建设提供支持和保障^[141]. 目前, 市场上陆续出现了生物样本库自动化设备, 包括自动化样本前处理系统和存储系统等, 具有操作自动便捷、存储集约高效、便于远程追溯管理和节省运行成本等特点^[142,143].

当前, 我国生物样本库的自动化依然处于起步阶段, 尤其是在低温存储设备研发中有待加强对低温生物学知识系统的科学认知, 以便实现活性生物样本的更高质量保存, 避免造成重要生命资源的不必要浪费^[144,145]. 因此, 在自动化样本存储系统开发时, 需充

分考虑将低温保护剂方案、冷冻工艺、复温工艺与自动化存储设备高度结合, 实现重要生物样本低温保存的“精准”管理, 才能真正推动高质量生物样本库的建设工作.

3 结论与展望

随着国家精准医疗战略和生物安全战略深入推进, 作为重要基石的各类生物样本库建设也进入了深水区, 尤其是低温生物学作为生物资源长期保存的重要技术手段得到了广泛重视. 近年来低温生物学领域的快速发展, 生物样本低温保存技术有了很大进步, 但仍有诸多基础理论和关键技术尚面临挑战. 特别是在绿色低温保护剂的开发及相关保护机制探索、创新玻璃化保存工艺及技术、复杂组织器官玻璃化保存跨尺度损伤机制以及冷冻活体生物样本创新复温方法等方面要加大基础研究和应用开发的力度. 这就需要生命科学基础研究领域、临床医学领域、低温生物学领域以及工程制造领域等多方共同努力协作, 以应用需求为导向, 多学科深度交叉, 才能解决高质量生物样本库建设中的“卡脖子”问题, 助力我国生物经济时代的快速发展.

参考文献

- Shi X H, Guo J. The international development status of biobank (in Chinese). *Chin J Clin Lab Mgt (Electronic Edition)*, 2017, 5: 19–23 [史晓红, 郭健. 国际生物样本库的发展现状. *中华临床实验室管理(电子杂志)*, 2017, 5: 19–23]
- Man Q H, Yu N, Yan F, et al. Thoughts on the current status and future development of biobank construction in China (in Chinese). *Chin Med Biotechnol*, 2018, 13: 289–293 [满秋红, 于农, 闫飞, 等. 我国生物样本库建设现状与未来发展的思考. *中国医药生物技术*, 2018, 13: 289–293]
- Gao H J. China biobank: Where are we going (in Chinese)? *Chin J Clin Lab Mgt (Electronic Edition)*, 2017, 5: 2–5 [郇恒骏. 中国生物样本库: 路在何方? *中华临床实验室管理(电子杂志)*, 2017, 5: 2–5]
- Gao H J. China biobanks are moving towards standardization (in Chinese). *Pract J Organ Transplant (Electron Ver)*, 2017, 5: 453 [郇恒骏. 中国生物样本库向标准化迈进. *实用器官移植(电子杂志)*, 2017, 5: 453]
- Zhan Q M. Technological innovation under the background of healthy Chinese development (in Chinese). *Chin J Neurotrauma Surg (Electronic Edition)*, 2018, 4: 193–196 [詹启敏. 健康中国发展背景下的科技创新. *中华神经创伤外科(电子杂志)*, 2018, 4: 193–196]
- Zhang Y, Li Q, Wang X, et al. China Biobanking. *Biobanking in the 21st Century*. Cham: Springer International Publishing, 2015. 125–140
- Le J J, Zhou X X, Yao H S, et al. Living biobank: current development and ethical considerations (in Chinese). *Sci Sin Vitae*, 2020, 50: 1464–1474 [乐晶晶, 周学迅, 姚海嵩, 等. 生物样本活库发展现状及伦理问题探讨. *中国科学: 生命科学*, 2020, 50: 1464–1474]
- Palechor-Ceron N, Krawczyk E, Dakic A, et al. Conditional reprogramming for patient-derived cancer models and next-generation living biobanks. *Cells*, 2019, 8: 1327
- Palen K, Zurko J, Johnson B D, et al. Manufacturing chimeric antigen receptor T cells from cryopreserved peripheral blood cells: time for a collect-and-freeze model? *Cytotherapy*, 2021, 23: 985–990

- 10 Yao X, Matosevic S. Cryopreservation of NK and T cells without DMSO for adoptive cell-based immunotherapy. *Biodrugs*, 2021, 35: 529–545
- 11 Han H X, Zhan T J, Cui M D, et al. Development of islet cryopreservation for type 1 diabetes cell therapy (in Chinese). *J Refrig*, 2021, 42: 36–47 [韩恒鑫, 占太杰, 崔梦冬, 等. 用于1型糖尿病细胞治疗的胰岛低温保存进展. *制冷学报*, 2021, 42: 36–47]
- 12 Patra T, Pathak D, Gupta M K. Strategies for cryopreservation of testicular cells and tissues in cancer and genetic diseases. *Cell Tissue Res*, 2021, 385: 1–19
- 13 Park J, Choi J K, Lee K E, et al. Characteristics of mouse embryonic fibroblasts by cryopreservation period for tissue engineering. *Toxicol Environ Health Sci*, 2021, 13: 417–423
- 14 Belli M, Palmerini M G, Bianchi S, et al. Ultrastructure of mitochondria of human oocytes in different clinical conditions during assisted reproduction. *Arch Biochem Biophys*, 2021, 703: 108854
- 15 Leung A Q, Baker K, Vaughan D, et al. Clinical outcomes and utilization from over a decade of planned oocyte cryopreservation. *Reprod Biomed Online*, 2021, 43: 671–679
- 16 Xue H, Yang B, Kristensen D D, et al. A freeze-stable formulation for DTWP and DTaP vaccines. *Hum Vaccines Immunother*, 2014, 10: 3607–3610
- 17 de Vries R J, Tessier S N, Banik P D, et al. Supercooling extends preservation time of human livers. *Nat Biotechnol*, 2019, 37: 1131–1136
- 18 Zhao Z X, Liu B L. Application of cryopreservation technology in biobank (in Chinese). *Chin J Refrig Tech*, 2020, 40: 66–71 [赵佐舜, 刘宝林. 低温保存技术在生物样本库中的应用. *制冷技术*, 2020, 40: 66–71]
- 19 Gao H J, Du L L, Zhang X Y, et al. Status, opportunities and challenges of biobanks (in Chinese). *Med J PUMCH*, 2018, 9: 172–176 [郜恒骏, 杜莉利, 张小燕, 等. 生物样本库发展的现状、机遇与挑战. *协和医学杂志*, 2018, 9: 172–176]
- 20 Chen J, Huang J, Xie X. Legal and ethical challenges in the construction of China's biobanks. *Biotechnol Law Report*, 2021, 40: 313–324
- 21 Gao H J. China Biobank—Theory and Practice (in Chinese). Beijing: Science Press, 2017 [郜恒骏. 中国生物样本库——理论与实践. 北京: 科学出版社, 2017]
- 22 Müller H, Dagher G, Loibner M, et al. Biobanks for life sciences and personalized medicine: importance of standardization, biosafety, biosecurity, and data management. *Curr Opin Biotechnol*, 2020, 65: 45–51
- 23 Du L L, Gao H J. Discussion on the sustainable development of biobank (in Chinese). *Transl Med J*, 2019, 8: 274–276+281 [杜莉利, 郜恒骏. 生物样本库可持续性发展的探讨. *转化医学杂志*, 2019, 8: 274–276+281]
- 24 Hewitt R E. Biobanking: the foundation of personalized medicine. *Curr Opin Oncol*, 2011, 23: 112–119
- 25 Annaratone L, De Palma G, Bonizzi G, et al. Basic principles of biobanking: from biological samples to precision medicine for patients. *Virchows Arch*, 2021, 479: 233–246
- 26 Zhan Q M. The strategic needs and key tasks of China's precision medicine development (in Chinese). *Chin J Neurotrauma Surg (Electronic Edition)*, 2015, 1: 1–3 [詹启敏. 中国精准医学发展的战略需求和重点任务. *中华神经创伤外科电子杂志*, 2015, 1: 1–3]
- 27 Wang H Y. New challenges for precision oncology (in Chinese). *Hainan Med J*, 2019, 30: 29–34 [王红阳. 肿瘤精准诊疗的挑战与应对. *海南医学*, 2019, 30: 29–34]
- 28 Shen D C. Ethical issues in the access and benefit-sharing of animal and plant biobank (in Chinese). Dissertation for Master's Degree. Wuhan: Huazhong University of Science and Technology, 2018 [沈大成. 动植物样本库获取与惠益分享的伦理问题探析. 硕士学位论文. 武汉: 华中科技大学, 2018]
- 29 Zhao X Y, Pei Y S, Gao H, et al. Development, application and discussion of biosafety biobank (in Chinese). *Chin Med Biotechnol*, 2021, 16: 378–382 [赵小燕, 裴宇盛, 高华, 等. 生物安全样本库的发展、应用现状与探讨. *中国医药生物技术*, 2021, 16: 378–382]
- 30 Huang P, Wei Q, Xu Y. Influencing factors and research progress of virus sample cryopreservation (in Chinese). *Chin J Exp Clin Virol*, 2020, 34: 683–688 [黄频, 魏强, 胥义. 病毒样本低温保藏的影响因素及研究进展. *中华实验和临床病毒学杂志*, 2020, 34: 683–688]
- 31 Guo N, Wei Q, Xu Y. Optimization of cryopreservation of pathogenic microbial strains. *J Biosaf Biosecur*, 2020, 2: 66–70
- 32 Comizzoli P, Wildt D E. Cryobanking Biomaterials from Wild Animal Species to Conserve Genes and Biodiversity: Relevance to Human Biobanking and Biomedical Research. *Biobanking of Human Biospecimens*. Cham: Springer, 2017. 217–235
- 33 Reygner J, Charrueau C, Delannoy J, et al. Freeze-dried fecal samples are biologically active after long-lasting storage and suited to fecal microbiota transplantation in a preclinical murine model of *Clostridioides difficile* infection. *Gut Microbes*, 2020, 11: 1405–1422
- 34 Merivaara A, Zini J, Koivunotko E, et al. Preservation of biomaterials and cells by freeze-drying: change of paradigm. *J Control Release*, 2021, 336: 480–498

- 35 Hua Z Z, Ren H S. Cryobiomedical Technology (in Chinese). Beijing: Science Press, 1994 [华泽钊, 任禾盛. 低温生物医学技术. 北京: 科学出版社, 1994]
- 36 Stewart S, He X. Intracellular delivery of trehalose for cell banking. *Langmuir*, 2018, 35: 7414–7422
- 37 Zhao G, Fu J. Microfluidics for cryopreservation. *Biotechnol Adv*, 2017, 35: 323–336
- 38 Zhan T, Liu K, Yang J, et al. Fe₃O₄ nanoparticles with carboxylic acid functionality for improving the structural integrity of whole vitrified rat kidneys. *ACS Appl Nano Mater*, 2021, 4: 13552–13561
- 39 Ahmed F E. Biobanking perspective on challenges in sample handling, collection, processing, storage, analysis and retrieval for genomics, transcriptomics and proteomics data. *Anal Methods*, 2011, 3: 1029–1038
- 40 Mazur P, Leibo S P, Chu E H Y. A two-factor hypothesis of freezing injury. *Exp Cell Res*, 1972, 71: 345–355
- 41 Mazur P. Physical factors implicated in the death of microorganisms at subzero temperatures. *Ann New York Acad Sci*, 2006, 85: 610–629
- 42 Toner M, Cravalho E G, Karel M. Thermodynamics and kinetics of intracellular ice formation during freezing of biological cells. *J Appl Phys*, 1990, 67: 1582–1593
- 43 Muldrew K, McGann L E. Mechanisms of intracellular ice formation. *Biophys J*, 1990, 57: 525–532
- 44 Bissoyi A, Nayak B, Pramanik K, et al. Targeting cryopreservation-induced cell death: a review. *Biopreserv Biobanking*, 2014, 12: 23–34
- 45 Jain M, Rajan R, Hyon S H, et al. Hydrogelation of dextran-based polyampholytes with cryoprotective properties via click chemistry. *Biomater Sci*, 2014, 2: 308–317
- 46 Khosla K, Zhan L, Bhati A, et al. Characterization of laser gold nanowarming: a platform for millimeter-scale cryopreservation. *Langmuir*, 2018, 35: 7364–7375
- 47 Chang T, Zhao G. Ice inhibition for cryopreservation: materials, strategies, and challenges. *Adv Sci*, 2021, 8: 2002425
- 48 Zhan T, Xu Y, Wang D, et al. Interaction of solute and water molecules in cryoprotectant mixture during vitrification and crystallization. *J Mol Liquids*, 2021, 325: 114658
- 49 Ma Y, Gao L, Tian Y, et al. Advanced biomaterials in cell preservation: hypothermic preservation and cryopreservation. *Acta Biomater*, 2021, 131: 97–116
- 50 Amidi F, Pazhohan A, Shabani Nashtaei M, et al. The role of antioxidants in sperm freezing: a review. *Cell Tissue Bank*, 2016, 17: 745–756
- 51 Pless G, Sauer I M, Rauen U. Improvement of the cold storage of isolated human hepatocytes. *Cell Transplant*, 2012, 21: 23–37
- 52 Best B P. Cryoprotectant toxicity: facts, issues, and questions. *Rejuvenation Res*, 2015, 18: 422–436
- 53 Polge C, Smith A U, Parkes A S. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature*, 1949, 164: 666
- 54 Yong K W, Laouar L, Elliott J A W, et al. Review of non-permeating cryoprotectants as supplements for vitrification of mammalian tissues. *Cryobiology*, 2020, 96: 1–11
- 55 Raju R, Bryant S J, Wilkinson B L, et al. The need for novel cryoprotectants and cryopreservation protocols: insights into the importance of biophysical investigation and cell permeability. *Biochim Biophys Acta (BBA)-Gen Subj*, 2021, 1865: 129749
- 56 Elliott G D, Wang S, Fuller B J. Cryoprotectants: a review of the actions and applications of cryoprotective solutes that modulate cell recovery from ultra-low temperatures. *Cryobiology*, 2017, 76: 74–91
- 57 Tunçer S, Gurbanov R, Sheraj I, et al. Low dose dimethyl sulfoxide driven gross molecular changes have the potential to interfere with various cellular processes. *Sci Rep*, 2018, 8: 14828
- 58 Awan M, Buriak I, Fleck R, et al. Dimethyl sulfoxide: a central player since the dawn of cryobiology, is efficacy balanced by toxicity? *Regenerative Med*, 2020, 15: 1463–1491
- 59 Lee J, Kim S K, Youm H W, et al. Effects of three different types of antifreeze proteins on mouse ovarian tissue cryopreservation and transplantation. *PLoS ONE*, 2015, 10: e0126252
- 60 He Z, Liu K, Wang J. Bioinspired materials for controlling ice nucleation, growth, and recrystallization. *Acc Chem Res*, 2018, 51: 1082–1091
- 61 Liu Z, Zheng X, Wang J. Bioinspired ice-binding materials for tissue and organ cryopreservation. *J Am Chem Soc*, 2022, 144: 5685–5701
- 62 Sun Y, Maltseva D, Liu J, et al. Ice recrystallization inhibition is insufficient to explain cryopreservation abilities of antifreeze proteins. *Biomacromolecules*, 2022, 23: 1214–1220
- 63 Bryant G, Koster K L, Wolfe J. Membrane behaviour in seeds and other systems at low water content: the various effects of solutes. *Seed Sci Res*, 2001, 11: 17–25
- 64 Sui X, Chen P, Wen C, et al. Exploring novel cell cryoprotectants based on neutral amino acids. *Chin J Chem Eng*, 2020, 28: 2640–2649

- 65 Moradi B, Faramarzi A, Ghasemi-Esmailabad S, et al. L-proline as a novel additive to cryopreservation media improved post-thaw quality of human spermatozoon via reducing oxidative stress. *Andrologia*, 2022, 54: e14301
- 66 Li X, Xu Y. Study on freezing characteristics of amino acid protectors and the mechanism of ice crystal inhibition (in Chinese). *J Refrig*, 2020, 41: 159–166 [李鑫, 胥义. 氨基酸类保护剂的冻结特性及抑制冰晶机理研究. *制冷学报*, 2020, 41: 159–166]
- 67 Liu M, Zhang X, Guo H, et al. DMSO-free cryopreservation of chondrocytes based on zwitterionic molecule and polymers. *Biomacromolecules*, 2019, 20: 3980–3988
- 68 Yang J, Cai N, Zhai H, et al. Natural zwitterionic betaine enables cells to survive ultrarapid cryopreservation. *Sci Rep*, 2016, 6: 37458
- 69 Geng H, Liu X, Shi G, et al. Graphene oxide restricts growth and recrystallization of ice crystals. *Angew Chem*, 2017, 129: 1017–1021
- 70 Luo M M, Guo N, Xu Y, et al. Effects of graphene oxide on crystallization behavior of VS55 during cooling and warming (in Chinese). *CIESC J*, 2019, 70: 370–378 [雒苗苗, 郭宁, 胥义, 等. 氧化石墨烯对VS55冻融过程结晶行为的影响. *化工学报*, 2019, 70: 370–378]
- 71 Huang J, Guo J, Zhou L, et al. Advanced nanomaterials-assisted cell cryopreservation: a mini review. *ACS Appl Bio Mater*, 2021, 4: 2996–3014
- 72 Bai G, Song Z, Geng H, et al. Oxidized quasi-carbon nitride quantum dots inhibit ice growth. *Adv Mater*, 2017, 29: 1606843
- 73 Yu H M, Xu Y, Liu K, et al. Effect of magnetic nanoparticles on isothermal crystallization behaviors of devitrified Vs55 (in Chinese). *CIESC J*, 2017, 68: 1262–1268 [于红梅, 胥义, 柳珂, 等. 磁纳米粒子对Vs55溶液反玻璃化等温结晶行为的影响. *化工学报*, 2017, 68: 1262–1268]
- 74 Zhu W, Guo J, Agola J O, et al. Metal-organic framework nanoparticle-assisted cryopreservation of red blood cells. *J Am Chem Soc*, 2019, 141: 7789–7796
- 75 Liu K, Xu Y, Yu H. Research on ice crystal growth inside the vitrified Vs55 with magnetic nanoparticles during devitrification by cryomicroscopy. *Chem Res Chin Univ*, 2019, 35: 542–548
- 76 Guo N, Xu Y, Luo M. Effects of graphene oxide on the crystallization behavior of VS55 during cooling and warming. *Chem Phys*, 2020, 534: 110735
- 77 Zhao J, Johnson M A, Fisher R, et al. Synthetic polyampholytes as macromolecular cryoprotective agents. *Langmuir*, 2018, 35: 1807–1817
- 78 Bailey T L, Stubbs C, Murray K, et al. Synthetically scalable poly(ampholyte) which dramatically enhances cellular cryopreservation. *Biomacromolecules*, 2019, 20: 3104–3114
- 79 Graham B, Bailey T L, Healey J R J, et al. Polyproline as a minimal antifreeze protein mimic that enhances the cryopreservation of cell monolayers. *Angew Chem Int Ed*, 2017, 56: 15941–15944
- 80 Deller R C, Vatish M, Mitchell D A, et al. Synthetic polymers enable non-vitreous cellular cryopreservation by reducing ice crystal growth during thawing. *Nat Commun*, 2014, 5: 1–7
- 81 Huang H, Choi J K, Rao W, et al. Alginate hydrogel microencapsulation inhibits devitrification and enables large-volume low-CPA cell vitrification. *Adv Funct Mater*, 2015, 25: 6839–6850
- 82 Zhao X, Chen F, Li Y, et al. Bioinspired ultra-stretchable and anti-freezing conductive hydrogel fibers with ordered and reversible polymer chain alignment. *Nat Commun*, 2018, 9: 3579
- 83 Xu Y, Rong Q, Zhao T, et al. Anti-freezing multiphase gel materials: bioinspired design strategies and applications. *Giant*, 2020, 2: 100014
- 84 Castro V I B, Craveiro R, Silva J M, et al. Natural deep eutectic systems as alternative nontoxic cryoprotective agents. *Cryobiology*, 2018, 83: 15–26
- 85 Hornberger K, Li R, Duarte A R C, et al. Natural deep eutectic systems for nature-inspired cryopreservation of cells. *AIChE J*, 2021, 67: e17085
- 86 Craveiro R, Castro V I B, Viciosa M T, et al. Influence of natural deep eutectic systems in water thermal behavior and their applications in cryopreservation. *J Mol Liquids*, 2021, 329: 115533
- 87 Luyet B J. Vitrification of water. *Phys Rev*, 1939, 56: 1244
- 88 Rall W F, Fahy G M. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196°C by vitrification. *Nature*, 1985, 313: 573–575
- 89 Feng H, Xu Y, Luo S, et al. Evaluation and preservation of vascular architectures in decellularized whole rat kidneys. *Cryobiology*, 2020, 95: 72–79
- 90 Yang J, Xu Y, Luo S, et al. Effect of cryoprotectants on rat kidney decellularization by freeze-thaw process. *Cryobiology*, 2022, 105: 71–82
- 91 Luo S C, Xu Y. Effects of different cryoprotective agents on decellularization of rat kidney by freeze-thaw method (in Chinese). *Chin J Med Phys*, 2021, 38: 877–882 [罗嗣昌, 胥义. 不同保护剂对大鼠肾脏冻融法脱细胞的影响. *中国医学物理学杂志*, 2021, 38: 877–882]
- 92 Rall W F, Wood M J, Kirby C, et al. Development of mouse embryos cryopreserved by vitrification. *Reproduction*, 1987, 80: 499–504
- 93 Vajta G, Holm P, Kuwayama M, et al. Open pulled straw (OPS) vitrification: a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. *Mol*

- [Reprod Dev](#), 1998, 51: 53–58
- 94 Martino A, Songsasen N, Leibo S P. Development into blastocysts of bovine oocytes cryopreserved by ultra-rapid cooling. [Biol Reprod](#), 1996, 54: 1059–1069
- 95 Desai N N, Goldberg J M, Austin C, et al. The new Rapid-i carrier is an effective system for human embryo vitrification at both the blastocyst and cleavage stage. [Reprod Biol Endocrinol](#), 2013, 11: 41
- 96 Kuwayama M, Vajta G, Ieda S, et al. Comparison of open and closed methods for vitrification of human embryos and the elimination of potential contamination. [Reproductive Biomed Online](#), 2005, 11: 608–614
- 97 Kuwayama M, Vajta G, Ieda S, et al. Highly efficient vitrification for cryopreservation of human oocytes and embryos: the Cryotop method. [Theriogenology](#), 2007, 67: 73–80
- 98 He X, Park E Y H, Fowler A, et al. Vitrification by ultra-fast cooling at a low concentration of cryoprotectants in a quartz micro-capillary: a study using murine embryonic stem cells. [Cryobiology](#), 2008, 56: 223–232
- 99 Zhan L, Guo S Z, Kangas J, et al. Conduction cooling and plasmonic heating dramatically increase droplet vitrification volumes for cell cryopreservation. [Adv Sci](#), 2021, 8: 2004605
- 100 Shi M, Ling K, Yong K W, et al. High-throughput non-contact vitrification of cell-laden droplets based on cell printing. [Sci Rep](#), 2015, 5: 17928
- 101 Akiyama Y, Shinose M, Watanabe H, et al. Cryoprotectant-free cryopreservation of mammalian cells by superflash freezing. [Proc Natl Acad Sci USA](#), 2019, 116: 7738–7743
- 102 Demirici U, Montesano G. Cell encapsulating droplet vitrification. [Lab Chip](#), 2007, 7: 1428–1433
- 103 Gilfanova R, Auclair K M, Hui A, et al. Reduced dimethyl sulfoxide concentrations successfully cryopreserve human hematopoietic stem cells with multi-lineage long-term engraftment ability in mice. [Cytotherapy](#), 2021, 23: 1053–1059
- 104 Kojayan G, Whaley D, Alexander M, et al. Improved cryopreservation yield of pancreatic islets using combination of lower dose permeable cryoprotective agents. [Cryobiology](#), 2019, 88: 23–28
- 105 Cao M, Xu Y, Dong Y. Improving mechanical properties of vitrified umbilical arteries with magnetic warming. [Fluid Dyn Mater Processing](#), 2021, 17: 123–139
- 106 Rodríguez-Fernández S, Álvarez-Portela M, Rendal-Vázquez E, et al. Analysis of cryopreservation protocols and their harmful effects on the endothelial integrity of human corneas. [Int J Mol Sci](#), 2021, 22: 12564
- 107 Song Y C, Pegg D E, Hunt C J. Cryopreservation of the common carotid artery of the rabbit: optimization of dimethyl sulfoxide concentration and cooling rate. [Cryobiology](#), 1995, 32: 405–421
- 108 Sharma A, Rao J S, Han Z, et al. Vitrification and nanowarming of kidneys. [Adv Sci](#), 2021, 8: 2101691
- 109 Chiu-Lam A, Staples E, Pepine C J, et al. Perfusion, cryopreservation, and nanowarming of whole hearts using colloiddally stable magnetic cryopreservation agent solutions. [Sci Adv](#), 2021, 7: eabe3005
- 110 Arav A, Friedman O, Natan Y, et al. Rat hindlimb cryopreservation and transplantation: a step toward “organ banking”. [Am J Transplant](#), 2017, 17: 2820–2828
- 111 Zhang Q, Zhao G X, Liu Y, et al. Progress and applications of minimum volume vitrification in biomedicine (in Chinese). [Sci Sin-Vitae](#), 2019, 49: 41–58 [张洪, 赵国旭, 刘艺, 等. 最小体积玻璃化冻存技术在生物医学领域的进展和应用. 中国科学: 生命科学, 2019, 49: 41–58]
- 112 Zhang X M, Zhou X L. Research progresses in vitrification by minimum volume method (in Chinese). [J Refrig](#), 2018, 39: 63–68+88 [张霄敏, 周新丽. 最小体积法玻璃化保存的研究进展. 制冷学报, 2018, 39: 63–68+88]
- 113 Song Y S, Adler D, Xu F, et al. Vitrification and levitation of a liquid droplet on liquid nitrogen. [Proc Natl Acad Sci USA](#), 2010, 107: 4596–4600
- 114 Feng H, Xu Y, Yang T. Study on Leidenfrost effect of cryoprotectant droplets on liquid nitrogen with IR imaging technology and non-isothermal crystallization kinetics model. [Int J Heat Mass Transfer](#), 2018, 127: 413–421
- 115 Adda-Bedia M, Kumar S, Lechenault F, et al. Inverse Leidenfrost effect: levitating drops on liquid nitrogen. [Langmuir](#), 2016, 32: 4179–4188
- 116 Xu Y, Wang T, Deng X, et al. Analysis on the Leidenfrost effect of cryoprotectant microdroplets on the liquid nitrogen surface (in Chinese). [Sci Sin Tech](#), 2017, 47: 190–196 [胥义, 王婷, 邓笑, 等. 低温保护剂微液滴在液氮表面的Leidenfrost效应及分析. 中国科学: 技术科学, 2017, 47: 190–196]
- 117 Peyridieu J F, Baudot A, Boutron P, et al. Critical cooling and warming rates to avoid ice crystallization in small pieces of mammalian organs permeated with cryoprotective agents. [Cryobiology](#), 1996, 33: 436–446

- 118 Mehl P M. Nucleation and crystal growth in a vitrification solution tested for organ cryopreservation by vitrification. *Cryobiology*, 1993, 30: 509–518
- 119 Mazur P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. *Am J Physiol-Cell Physiol*, 1984, 247: C125–C142
- 120 Jacobsen I A, Pegg D E, Starklint H, et al. Effect of cooling and warming rate on glycerolized rabbit kidneys. *Cryobiology*, 1984, 21: 637–653
- 121 Ketterer F D, Holst H I, Lehr H B. Improved viability of kidneys with microwave thawing. *Cryobiology*, 1971, 8: 395
- 122 Cheng Y, Yu Y, Zhang Y, et al. Cold-responsive nanocapsules enable the sole-cryoprotectant-trehalose cryopreservation of β cell-laden hydrogels for diabetes treatment. *Small*, 2019, 15: 1904290
- 123 Jin B, Mazur P. High survival of mouse oocytes/embryos after vitrification without permeating cryoprotectants followed by ultra-rapid warming with an IR laser pulse. *Sci Rep*, 2015, 5: 9271
- 124 Panhwar F, Chen Z, Hossain S M C, et al. Near-infrared laser mediated modulation of ice crystallization by two-dimensional nanosheets enables high-survival recovery of biological cells from cryogenic temperatures. *Nanoscale*, 2018, 10: 11760–11774
- 125 Manuchehrabadi N, Gao Z, Zhang J, et al. Improved tissue cryopreservation using inductive heating of magnetic nanoparticles. *Sci Transl Med*, 2017, 9: eaah4586
- 126 Liu X, Zhao G, Chen Z, et al. Dual suppression effect of magnetic induction heating and microencapsulation on ice crystallization enables low-cryoprotectant vitrification of stem cell-alginate hydrogel constructs. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2018, 10: 16822–16835
- 127 Pan J, Shu Z, Zhao G, et al. Towards uniform and fast rewarming for cryopreservation with electromagnetic resonance cavity: numerical simulation and experimental investigation. *Appl Thermal Eng*, 2018, 140: 787–798
- 128 Ren S, Shu Z, Pan J, et al. Development of a Novel Electromagnetic Rewarming Technology for the Cryopreservation of Stem Cells with Large Volume. In: *Novel Perspectives of Stem Cell Manufacturing and Therapies*. London: IntechOpen, 2020
- 129 Solanki P K, Rabin Y. Thermomechanical stress analysis of rabbit kidney and human kidney during cryopreservation by vitrification with the application of radiofrequency heating. *Cryobiology*, 2021, 100: 180–192
- 130 Jin B, Kleinhans F W, Mazur P. Survivals of mouse oocytes approach 100% after vitrification in 3-fold diluted media and ultra-rapid warming by an IR laser pulse. *Cryobiology*, 2014, 68: 419–430
- 131 Khosla K, Wang Y, Hagedorn M, et al. Gold nanorod induced warming of embryos from the cryogenic state enhances viability. *ACS Nano*, 2017, 11: 7869–7878
- 132 Hou Y, Lu C, Dou M, et al. Soft liquid metal nanoparticles achieve reduced crystal nucleation and ultrarapid rewarming for human bone marrow stromal cell and blood vessel cryopreservation. *Acta Biomater*, 2020, 102: 403–415
- 133 Wang J, Zhao G, Zhang Z, et al. Magnetic induction heating of superparamagnetic nanoparticles during rewarming augments the recovery of hUCM-MSCs cryopreserved by vitrification. *Acta Biomater*, 2016, 33: 264–274
- 134 Han Z, Sharma A, Gao Z, et al. Diffusion limited cryopreservation of tissue with radiofrequency heated metal forms. *Adv Healthcare Mater*, 2020, 9: 2000796
- 135 Pan J, Shu Z, Ren S, et al. Determination of dielectric properties of cryoprotective agent solutions with a resonant cavity for the electromagnetic rewarming in cryopreservation. *Biopreserv Biobanking*, 2017, 15: 404–409
- 136 Wusteman M, Robinson M, Pegg D. Vitrification of large tissues with dielectric warming: biological problems and some approaches to their solution. *Cryobiology*, 2004, 48: 179–189
- 137 Wang T, Zhao G, Deng Z, et al. Theoretical investigation of a novel microwave antenna aided cryovial for rapid and uniform rewarming of frozen cryoprotective agent solutions. *Appl Thermal Eng*, 2015, 89: 968–977
- 138 Cao Y, Hassan M, Cheng Y, et al. Multifunctional photo- and magnetoresponsive graphene oxide- Fe_3O_4 nanocomposite-alginate hydrogel platform for ice recrystallization inhibition. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2019, 11: 12379–12388
- 139 Etheridge M L, Xu Y, Rott L, et al. RF heating of magnetic nanoparticles improves the thawing of cryopreserved biomaterials. *Technology*, 2014, 02: 229–242
- 140 Linsen L, Van Landuyt K, Ectors N. Automated sample storage in biobanking to enhance translational research: the bumpy road to implementation. *Front Med*, 2020, 6: 309
- 141 Peakman T, Elliott P. Current standards for the storage of human samples in biobanks. *Genome Med*, 2010, 2: 72
- 142 Dai H Q, Yu L, Li Y, et al. Application and expectation of automatic storage system in biobank (in Chinese). *Chin J Clin Lab Mgt (Electronic Edition)*, 2017, 5: 46–50 [戴涵清, 俞磊, 李艺, 等. 自动化存储管理系统在生物样本库领域的应用及展望. 中华临床实验室管理(电子杂志), 2017, 5: 46–50]

2017, 5: 46–50]

- 143 Baber R, Kiehntopf M. Automation in biobanking from a laboratory medicine perspective. *J Laboratory Med*, 2019, 43: 329–338
- 144 Ming X, Zhou X X. Application status of automation technology in biobank (in Chinese). *Chin Med Biotechnol*, 2015, 10: 498–500 [明星, 周学迅. 自动化在生物样本库中的应用现状. *中国医药生物技术*, 2015, 10: 498–500]
- 145 Wang Y H, Shang Y, Wei P, et al. The application of automatic storage equipments of biobank and the comparison among different brands of them (in Chinese). *China Med Equip*, 2019, 16: 172–176 [王衍海, 尚悦, 魏浦, 等. 生物样本库自动化存储设备的应用及其不同品牌设备比较. *中国医学装备*, 2019, 16: 172–176]

Cryobiology for biobanking

XU Yi^{1,2}, GUO Ning^{1,2}, YANG GuoLiang^{1,2}, ZHAN TaiJie^{1,2}, HAN HengXin^{1,2}, CHENG Yue³,
ZHAO Gang⁴, WEI Qiang⁵, ZHOU XueXun⁶ & LIU BaoLin^{1,2}

1 Institute of Biothermal Science and Technology, University of Shanghai for Science and Technology, Shanghai 200093, China;

2 Shanghai Technical Service Platform for Cryopreservation of Biological Resources, Shanghai 200093, China;

3 Department of Biomedical Engineering, Anhui Medical University, Hefei 230032, China;

4 Department of Electronic Engineering and Information Science, University of Science and Technology of China, Hefei 230027, China;

5 National Pathogen Resource Center, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China;

6 Cryobiology Study Group, Biobank Branch, China Medicinal Biotechnology Association, Shanghai 200093, China

Biobank, as an important cornerstone of precision medicine, excellent animal and plant breeding, and biosafety, has made great progress, but the need for a high-quality living biobank is becoming increasingly urgent. Cryopreservation is an important technical means for the high-quality preservation of live biological materials, but many challenges remain in cryobiology during the construction of a living biobank, e.g., determining a multilevel cryogenic damage mechanism, developing low-toxicity cryoprotectants, optimizing the vitrification process, avoiding rewarming damage, and developing automated low-temperature storage technology. Integrating multiple disciplines, such as clinical medicine, cell biology, zoology and botany, microbiology, and cryogenic bioengineering, is urgently needed to break through the existing bottlenecks, thereby providing an important guarantee for the high-quality preservation and application of biological resources.

biobanking, cryobiology, cryopreservation, cryoinjury

doi: [10.1360/SSV-2022-0171](https://doi.org/10.1360/SSV-2022-0171)