



# [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 01821674.9

[43] 公开日 2005 年 10 月 19 日

[11] 公开号 CN 1685210A

[22] 申请日 2001.12.28 [21] 申请号 01821674.9

[30] 优先权

[32] 2001.1.2 [33] US [31] 60/259,418

[86] 国际申请 PCT/US2001/049595 2001.12.28

[87] 国际公布 WO2002/076203 英 2002.10.3

[85] 进入国家阶段日期 2003.7.1

[71] 申请人 苏帕契勒技术控股有限公司

地址 澳大利亚维多利亚

[72] 发明人 S·D·普里恩 J·布兰顿

B·伍德 A·J·卡斯尔

[74] 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司

代理人 周承泽

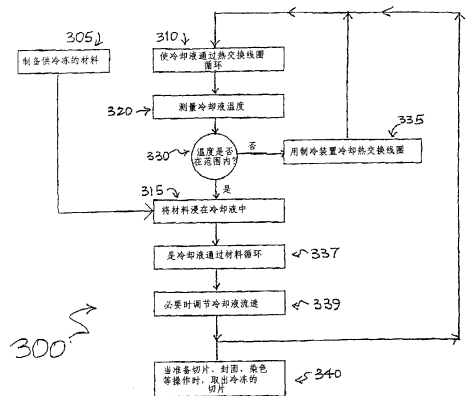
权利要求书 3 页 说明书 10 页 附图 6 页

[54] 发明名称 为组织学和病理学检验制备组织样品的的方法和系统

[57] 摘要

通过将材料浸入装有冷却液的容器中、并以基本上恒定的预定速率和温度使冷却液环流通过该材料以冷冻此材料，从而将存活的生物材料进行低温保藏(低温保存)。所述材料可以无需制备直接浸入冷却液，或在冷冻之前进行化学制备。本发明的方法以足够快的速率冷冻生物材料，以避免在细胞结构内形成冰晶(玻璃化)，并可使样品保持解剖学结构且在解冻后仍有生化活性。冷却液的温度较佳为 -20℃ 到 -30℃，这个温度范围足够使细胞膜中由于热变化而导致的应力破坏的形成和其它人为构造减少到最小程度。与病理学和组织学技术所用的其它低温保存法冷冻的细胞相比，采用本发明方法冷冻的细胞具有明显较小的细胞和细胞内损伤。由于本发明可冷冻生物材料，这样材料被玻璃化，故冷冻后细胞内的生化活性未受损失，因此本发明的

各种实施方案可用于系统，以为制备生物材料值这项低温病理学和免疫组织化学的新技术用于研究和患者护理领域。



1. 一种方法，它包括：  
冷冻生化活性组织样品，其中所述冷冻包括：
  - 5 将组织样品浸入冷却液中；  
以基本上恒定的预定速率和温度使所述冷却液环流通过所述组织样品，以冷冻该组织样品使其玻璃化；其中所述组织样品保持其解剖学结构且在解冻后仍有生化活性；  
解冻所述组织样品；以及
  - 10 检测所述解冻的组织样品。
2. 如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，它还包括将所述组织样品切片。
3. 如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，检测所述解冻的组织样品包括组织学检测。
4. 如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，检测所述解冻的组织样品包括超  
15 微结构检测。
5. 如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，检测所述解冻的组织样品包括使用免疫组织化学检测。
6. 如权利要求 5 所述的方法，其特征在于，免疫组织化学包括荧光标记的抗体染色。
- 20 7. 如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，约 55%以上所述组织样品的细胞解剖学结构未受损伤且在解冻后仍有生化活性。
8. 如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，约 45%以上所述组织样品的细胞解剖学结构未受损伤且在解冻后仍有生化活性。
9. 如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，约 85%以上的所述组织样品保持其  
25 解剖学结构且在解冻后未受到损伤。
10. 如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，所述冷却液的温度维持在约-20℃到-30℃之间。
11. 如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，所述冷却液流过所述组织样品的速率大约是：每英尺的冷却液每分钟以约 35 升的量通过不大于约 24 英寸宽×48  
30 英寸深的面积。
12. 如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，所述冷却液由浸在冷却液中的马达/推进器装置循环。

13. 如权利要求 1 所述的方法, 其特征在于, 它还包括: 将所述冷却液环流通过浸没在该冷却液中的多通路热交换线圈, 其中所述热交换线圈至少能从所述冷却液中除去的热量与该冷却液从组织样品中除去的热量相同。

14. 一种用于制备供检测的组织样品的方法, 其特征在于, 所述方法包括:

5 将生物活性组织样品浸入冷却液中; 以及

以基本上恒定的预定速率和温度使所述冷却液环流通过所述组织样品, 直接将其冷冻到约 $-30^{\circ}\text{C}$ 以上的温度, 使组织样品玻璃化, 所述组织样品保持其解剖学结构, 且所述组织样品在解冻后仍有生化活性。

15. 如权利要求 14 所述的方法, 其特征在于, 它还包括将所述组织样品切片。

10 16. 如权利要求 14 所述的方法, 其特征在于, 它还包括解冻所述组织样品。

17. 如权利要求 14 所述的方法, 其特征在于, 检测包括组织学检测。

18. 如权利要求 14 所述的方法, 其特征在于, 检测包括超微结构检测。

19. 如权利要求 14 所述的方法, 其特征在于, 检测包括使用免疫组织化学检测。

15 20. 如权利要求 19 所述的方法, 其特征在于, 免疫组织化学包括荧光标记的抗体染色。

21. 如权利要求 14 所述的方法, 其特征在于, 约 40%以上的所述组织样品保持其解剖学结构且在解冻后仍有生化活性。

20 22. 如权利要求 14 所述的方法, 其特征在于, 约 80%以上的所述组织样品保持其解剖学结构且在解冻后仍有生化活性。

23. 如权利要求 14 所述的方法, 其特征在于, 约 85%以上的所述组织样品保持其解剖学结构且在解冻后未受到损伤。

24. 如权利要求 14 所述的方法, 其特征在于, 所述冷却液的温度维持在约 $-20^{\circ}\text{C}$ 到 $-30^{\circ}\text{C}$ 之间。

25 25. 如权利要求 14 所述的方法, 其特征在于, 所述冷却液流过所述组织样品的速率大约是: 每英尺的冷却液每分钟以约 35 升的量通过不大于约 24 英寸宽 $\times$ 48 英寸深的面积。

26. 如权利要求 14 所述的方法, 其特征在于, 所述冷却液由浸在冷却液中的马达/推进器装置循环。

30 27. 如权利要求 14 所述的方法, 其特征在于, 它还包括: 将所述冷却液环流通过浸没在该冷却液中的多通路热交换线圈中, 其中所述热交换线圈至少能从所述冷却液中除去的热量与该冷却液从组织样品中除去的热量相同。

28. 一种用于制备供检测的组织样品的系统，其特征在于，所述系统包括：  
配置冷却液贮液器以将生化活性组织样品浸在冷却液中；  
装置一个或多个冷却液循环器以循环所述冷却液；  
用于从所述冷却液中带走热量的热交换线圈；  
5 配置致冷装置以从所述热交换线圈中带走热量；其中  
所述冷却液贮液器、所述一个或多个循环器和所述致冷装置相互协作，以通过使冷却液以基本上恒定的预定速率和温度环流通过所述组织样品使所述组织样品玻璃化，从而将组织样品直接冷却到约-30℃以上的温度，所述组织样品保持其解剖学结构，且所述组织样品在解冻后仍有生化活性。
- 10 29. 如权利要求 28 所述的系统，其特征在于，检测包括组织学检测。  
30. 如权利要求 28 所述的系统，其特征在于，检测包括超微结构检测。  
31. 如权利要求 28 所述的系统，其特征在于，检测包括使用免疫组织化学检测。
- 15 32. 如权利要求 31 所述的系统，其特征在于，免疫组织化学包括荧光标记的抗体染色。
33. 如权利要求 28 所述的系统，其特征在于，约 40%以上的所述组织样品保持其解剖学结构且在解冻后仍有生化活性。
34. 如权利要求 28 所述的系统，其特征在于，约 80%以上的所述组织样品保持其解剖学结构且在解冻后仍有生化活性。
- 20 35. 如权利要求 28 所述的系统，其特征在于，约 85%以上的所述组织样品保持其解剖学结构且在解冻后未受到损伤。
36. 如权利要求 28 所述的系统，其特征在于，所述冷却液的温度维持在约-20℃到-30℃之间。
- 25 37. 如权利要求 28 所述的方法，其特征在于，所述冷却液流过所述组织样品的速率大约是：每英尺的冷却液每分钟以约 35 升的量通过不大于约 24 英寸宽×48 英寸深的面积。
38. 如权利要求 28 所述的系统，其特征在于，所述循环器是浸在冷却液中的马达/推进器装置。
- 30 39. 如权利要求 28 所述的系统，其特征在于，所述冷却液环流通过浸没在该冷却液中的多通路热交换线圈中，其中所述热交换线圈至少能从所述冷却液中除去的热量与该冷却液从组织样品中除去的热量相同。

## 为组织学和病理学检验制备组织样品的方法和系统

### 5 相关申请的交叉参考

本申请要求获得 2001 年 1 月 2 日提交的题为《为组织学和病理学检验制备组织样品的方法和系统》的美国临时专利申请系列号 60/259,418 的权益。

### 发明领域

10 本发明总的涉及低温保藏,更具体地说,本发明涉及用于检验和诊断目的的保藏方法。

### 发明背景

在组织学实验室中,可对组织等生物材料进行各种处理以在载玻片上制备供  
15 显微镜下观察的标本。病理学家仔细研究了载玻片并公布了他们的发现,这有助于医生诊断疾病或疾病过程。组织病理学通常依赖于样品检查,样品是用一种或两种基础方法制备的。在第一种组织学方法中,样品在实验室中经过显著加工,比如固定以保护组织、脱水以从组织中除去水分、用石蜡等包埋剂渗透、包埋、截断或切割组织切片以置于载玻片上、封固切片以及染色切片以增强细节。第二种方法,低  
20 温制备,明显简化了第一种方法的过程,它通常包括在冷的液体或环境中骤冻、切片、封固、和染色。

当第一种方法显著地产生较高的显形时,它需要延长处理时间,通常至少为 18-24 小时。因此,这种方法无法用于需要快速诊断病理过程的情况,比如在外科手术中。此外,所用的这种加工方法可能会破坏组织的全部或部分生物活性。

25 第二种方法有速度上的优势(30 分钟至 1 小时),但用低温制备法准备的组织标本通常会由于有冰晶形成而造成细胞损伤,冰晶的形成还会造成组织内感兴趣分子的生物功能的丧失,并完全丧失组织完整性,这表现为降解的解剖学结构。许多商业病理实验室反对在所有情况下将冷冻的组织用于免疫组织化学,但在特殊情况下可以使用,因为保藏组织中冰晶的形成在样品中造成了许多反常的人为构造,这  
30 使得对诊断结果的分析十分困难,在某些情况下甚至是不可能的。

随着多克隆抗体和单克隆抗体的出现,人们对这两种传统的显微组织学和病理学的关注已经由简单的主观观察转移到直接的客观染色法。当单独的组织病理学

无法得出结论时, 这些较新的免疫组织化学(IHC)技术有助于确定诊断结果。然而, IHC技术取决于标本中生物学上完整的受体以适当的染色出现。因此, 它需要使用不限制在制备结束后存在的活性生物材料的量的组织标本制备法。

## 5 发明概要

因此, 需要一种改进的方法来低温保藏生存的单细胞、组织、器官、核酸或其它生物活性分子, 该方法至少能避免目前采用的方法中所固有的一些问题。因此, 本发明提供了一种低温保藏以冷冻生化活性组织样品的方法, 该方法将样品浸入冷却液中, 并使该冷却液环流通过该材料。冷却液以基本上恒定的预定速率和温度环流通过组织样品, 将其冷冻, 这样组织样品被玻璃化, 而组织样品仍保持其解剖学结构且在解冻后仍有生化活性。在至少一个实施方案中, 冷却液被维持在约-20℃到-30℃之间的温度, 冷却液流过组织样品的速率大约为35升/分钟/英尺冷却液, 该冷却液通过不大于约24英寸(宽)×48英寸(深)的面积。此外, 本发明至少一个实施方案将生物活性组织样品浸在冷却液中以将样品直接冷冻到约-30℃以上。本发明另一个实施方案让冷却液通过浸在冷却液中的多通路热交换线圈循环, 当从组织样品中除去冷却液时, 这里的热交换线圈能够从冷却液中排除至少等量的热。至少一个实施方案提供了实现上述方法的系统。

本发明至少一个实施例的目的是应用一种方法以冷冻生物材料, 其中可以避免形成冰晶和应力破坏, 且在冷冻后保持了细胞的生化功能。

20 本发明至少一个实施例的一个优点是低温保藏恢复率明显增加, 这是因为生物材料在冷冻期间被玻璃化。

本发明至少一个实施例的另一优点是低温保藏恢复率提高, 这是因为生物材料在足够高的温度下玻璃化, 避免了细胞膜内形成应力破坏。

25 本发明至少一个实施例的另一优点是低温保藏恢复率是这样的, 即与现有方法相比, 比例相当高的生物材料保持其解剖学结构且在解冻后仍有生化活性。

本发明至少一个实施例的另一优点是低温保藏恢复率是这样的, 即可在短于传统病理学技术的时间内对生物材料样品本身进行切片、处理和随后的组织学、超微结构和免疫组织化学检验, 因此缩短了得到结果的时间。

30 本发明至少一个实施例的另一优点是一旦被冷冻, 现有的低温保藏贮存设备和机制即可用于保存上述冷冻的生物材料。

## 附图简述

在参照附图考虑以下描述和权利要求之后，将能理解本发明的其它目的、优点、特征和特性，和相关结构要素的方法、操作和功能，以及制造零件和经济学的组合，所有这些都是本说明书的一部分，其中，相同的参考数值在各图中表示相应的部件：

5 图 1 是适用于实施本发明至少一个实施例的方法的冷却装置的侧视图。

图 2 是图 1 中的冷却装置的截面图，它指出了适合冷冻相对大量生物材料的冷却系统的执行过程。

图 2A 是图 1 中的冷却装置的截面图，它是与本发明一个实施方案的螺旋输送机配合使用的。

10 图 3 是阐述本发明至少一个实施例的系统的流程图。

图 4 是显示各种现有技术的冷冻方法和本发明优选实施方案的冷冻方法之间根据试验比较结果的柱形图。

图 5 是通过显微镜观察到的视野，它显示了用液氮法以及本发明优选实施方案的冷冻法进行冷冻-解冻循环处理后，非低温保护的葡萄组织的形态学外观。

15 图 6 是通过显微镜观察到的视野，它显示了用标准低温制备技术以及本发明优选实施方案的方法冷冻后，心脏组织的形态学外观。

图 7 是电子显微镜的视野，它显示了采用本发明优选实施方案的方法后可以看到的细胞线粒体复杂的超微结构特征。

20 本发明优选实施方案的详细描述

在以下详细描述的首选实施方案中，参考了作为此处组成部分的附图，并以图解的方式显示了特别优选的实施方案，本发明可按这些方案实施。这些实施方案描述得非常详细，足以使精通此领域的技术人员实施本发明，同时，应该理解的是，其它的实施方案也是可以使用的，且在不背离本发明精神和范围的情况下可以做出逻辑、机械、化学和电子改变。为避免不是使精通此领域的技术人员实践本发明所必需的描述，此说明书可以省略某些精通此领域的技术人员已知的信息。因此，以下详细描述没有限制的意思，同时本发明的范围仅由附加的权利要求书确定。

25 首先参照图 1 和 2 讨论了适合实施本发明至少一个实施例的一种冷却装置，通常将其称为冷却装置 100。冷却装置 100 较佳包括装有冷却液 140 的容器 110。浸没在冷却液 140 中的是循环器 134，如具有推进器 132 的马达 130、热交换线圈 120 和支架 150，该支架 150 在一个实施例中包括用于支持生物材料冷冻的托盘 155。生物材料可包括但不限于存活的单细胞、组织和器官、核酸和其它生物活性

分子。不要求生物材料是种特异性的。在容器 110 之外与热交换线圈 120 相连的是致冷器 190。

容器 110 可以是将要冷冻的生物材料浸入冷却液 140 中所需的任何尺寸，该冷却液的体积为 12 英寸×24 英寸×48 英寸。按照本文所述的内容，也可以使用其它尺寸的容器。例如，在一个实施例中(未阐述)，容器 110 的大小为刚好容纳足够的冷却液 140，这样，诸如小瓶、试管、烧杯、量筒等之类的容器就可以放在容器 110 中，用于快速冷冻含有生物材料和低温保护剂的悬浮液。在其它实施例中，容器 110 大到足以将整个器官或有生物体完整地浸入，以进行快速冷冻。将可理解，容器 110 可制成较大的，或者制成较小的，这要根据有效适应要冷冻的生物材料的各种尺寸和数量的需要而定。可以在浸到容器 110 之前用低温保护剂处理生物材料。

容器 110 中装有冷却液 140。在一个实施例中，该冷却液是食物级溶质。食物级质量液体的好例子是基于丙二醇、氯化钠等的那些液体。在另一实施例中，冷却液本身就是低温保护剂，如二甲基亚砷(DMSO)、乙二醇、丙二醇、聚乙二醇等。注意到在一些例子中，低温保护剂本身就是食物级质量液体。在其它实施例中，用其它液体作为冷却液，优选溶质。虽然可使用各种容器来装生物材料，但是本发明的一些实施例直接将生物材料浸入冷却液中进行快速和有效的冷冻。这种直接浸入的方法可简化一些组织和器官的低温保藏。

为了在冷冻生物材料的同时避免冰晶的形成，本发明的一个实施例以不超过 24 英寸宽×48 英寸深的面积中含有每英尺冷却液每分钟 35 升的相对恒定速率将冷却液 140 环流通过要冷冻的生物材料。必需的环流由一个或多个循环器 134(如马达 130)提供。在本发明的至少一个实施例中，浸没的马达 130 驱动推进器 132，将冷却液 140 环流通过要冷冻的生物材料。也可使用与本发明目的一致其它循环器 134，包括各种泵(未阐述)。在本发明的至少一个例子中，使用除了马达 130 以外的至少一个循环器 134 来增加环流的冷却液的面积和体积。在使用多个循环器 134 的实施例中，冷却液环流的面积和体积的增加与所使用的各个附加的循环器成正比。例如，在一个优选的实施例中，使用一个附加的循环器来推进各英尺要环流的冷却液通过不超过约 24 英寸宽×48 英寸深的面积。

较佳的是，可控制马达 130，以维持冷却液以恒定的预定速率流过要保藏的生物材料，而同时维持容器 110 内所有的点上的冷却液温度平均分布在 $\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 之内。冷却液以基本上恒定的预定速率环流过生物材料，这样可恒定地、准确地移走热量，从而使生物材料在冷冻期间玻璃化。在一个实施例中，测量和处理冷却液的

特性如粘度、温度等，然后将控制信号传送给马达 130，以根据需要增加或减少推进器的旋转速率或扭矩。在其它实施例中，将马达 130 设为在一定范围的液体条件中维持给定的旋转速率。在这个例子中，由马达 130 赋予的推进器 132 的扭矩或旋转速率不是由外部控制的。要注意的是，不需要外部的泵、轴或滑轮来实施本发明的优选实施方案。将马达 130 或者其它循环器 134 直接浸入冷却液 140 中。结果是，冷却液 140 不仅将置于容器 110 中的生物材料冷冻，而且还使马达 130 冷却。

热交换线圈 120 较佳是“多通路线圈”，它使致冷剂通过多个通路(即三个或多个通路)输送，这与常规的致冷线圈不同，在常规的致冷线圈中致冷剂通常被限制在一个或两个连续的通路中。此外，线圈的大小直接与含有准确量的冷却液 140 的横截面面积有关。例如，在优选的实施例中，容器 110 长 1 英尺、深 2 英尺、宽 4 英尺，而所使用的热交换线圈 120 是 1 英尺×2 英尺。如果容器 110 的长度增加到 20 英尺，则热交换线圈 120 的长度也增加到 20 英尺。结果，可将热交换线圈 120 制成为处理相同的热量负荷所需的常规线圈的大约 50% 尺寸。循环器 134(如马达 130)将冰冷的冷却液 140 循环通过要冷冻的生物材料，然后将较温的冷却液转运到浸没在该冷却液 140 中的热交换线圈 120。在至少一个实施例中，热交换线圈 120 与致冷器 190 连接，该致冷器从热交换线圈 120 和系统中除去热量。

在一个优选的实施例中，设计致冷器 190 用于匹配热交换线圈 120 的负荷需求，以便以平衡和有效的方式从系统中除去热量，获得受控、快速冷冻的材料。致冷器 190 的效率与用于通过有效供给或热交换线圈 120 和致冷器 190 中使用的压缩机的有效输出控制吸入压力的方法直接相关。这种方法要求致冷剂和冷却液 140 的温度以及冷凝温度和环境温度之间维持在非常接近的公差范围之内。这些温度标准和热交换线圈 120 的设计都使热交换线圈 120 得以更有效地供给，这反过来又使压缩机以平衡和紧紧控制的方式得到供给，从而使压缩机的性能超出制造商指定的标准等级的 25% 以上。

注意到在图 1 阐述的实施例中，致冷器 190 处于外部、遥控安置的致冷系统。但是，在另一实施例中(未阐述)，致冷器 190 被加到容器 110 的另一部分中。应理解，致冷器 190 的各种构型对于冷却装置 100 的某些构型或多或少是合适的。例如，如果容器 110 非常大，可能需要一种分离的致冷器 190，而可移动的实施例可能受益于整合的致冷器 190。这种整合仅仅在通过执行上述原则而获得功效的情况下才是可能的，尤其是使用尺寸减小了的热交换线圈。

在一个优选的实施例中，借助于致冷器 190 和热交换线圈 120，冷却液被冷却至 -20°C 到 -30°C 之间，整个冷却液的温度差别小于约 +/-0.5°C。在其它实施例中，

冷却液被冷却到-20℃到-30℃的温度范围之外，以控制物质冷冻的速率。其它实施例控制冷却液的环流速率，以获得所需的冷冻速率。或者，为了促进特殊的冷冻速率，可改变冷却液的体积。应理解，冷却液循环速率、冷却液体积和冷却液温度的各种组合都可用于实现所需的冷冻速率。

5 现在参照图 2，图 1 中的冷却装置的截面图，它指出了适合冷冻相对大量生物材料的冷却系统的执行过程，讨论适合用于冷冻量大的生物材料的冷却系统 100 的实施方案。图 2 中与图 1 中相同、相似或同样的参考数值表示相同、相似或同样的特征。容器 110 含有冷却液 140，支架 150 可在该液体中降低。支架 150 可移动地连接于支架支持物 210，这样支架 150 可升可降，有利于物质将物质放到容器 110  
10 中。

在使用时，要冷冻的生物材料放在支架 150 的托盘 155 上。较佳的是，托盘 155 是线状的、网筛或者其它形式制成的，以使冷却液 140 可自由地循环通过放置于其上的物品的上面、下面和/或四周。较佳的是，一旦冷却液被冷却到所需的温度，使用支架支持物 210 将支架 150 下降进入容器 110 中，以将托盘 155 浸没在冷却液 140 中。可人工或使用本领域熟练的技术人员已知的各种齿轮、链条和/或滑轮构型使支架 150 下降。循环器 134 将冷却液 140 循环通过放置于托盘 155 中的物质，以产生快速和受控的冷冻。应理解，可采用其它的方式将生物材料浸入容器 110 中，采用自动升降系统在所有情况中不一定是最佳的。  
15

现在参照图 2A，讨论了采用多层螺旋途径输送机系统的本发明的一个实施方案。如图所示，螺旋输送机 200 可适合内部容器 110 以将生物材料浸到冷却液 140 中。在使用时，一旦冷却液被冷冻到所需温度，需要冷冻的材料就被加到进料装置 160 中，它们在这里被带到输送机皮带 170 上。所述材料从进料装置 160 输送到螺旋 175 下面的冷却液 140 中，从螺旋 176 上面的冷却液 140 中出来，并从出料装置 180 处的螺旋输送机中出来。如上所述，冷却液 140 优选保持在恒定的预定温度，并以确保迅速、安全地冷冻要冻结的材料的速度循环。材料浸在冷却液 140 中所化的时间可以通过调节驱动装置 230，或通过其它合适的方法改变。较为理想的，结合冷却液 140 的温度和循环速度，调节输送机皮带 170 的速度，这样，当材料通过多层螺旋途径输送系统 200 上的容器 110 时，可以从材料中准确地排出所需的热量。  
25

现在参照图 3，阐述本发明一个实施例的方法，一般将其指定为参考数值 300。所阐述的方法从步骤 310 开始，在那里冷却液循环通过一个热交换线圈。该热交换线圈可操作性地与上述致冷系统相连，用于减少冷却液循环通过热交换线圈时的温度。在步骤 320 中，测量冷却液的温度，步骤 330 则测定冷却液的温度是否在最佳  
30

的温度范围之内。这个最佳的冷却液温度范围对于不同的应用可以不同，但是，对于许多应用，优选的最佳温度范围为-20℃到-30℃。

如果测得冷却液的温度不在最佳的预定温度范围之内，则进行步骤 335。在步骤 335 中，热交换线圈被致冷器冷却，此方法回到步骤 310，在该步骤中，冷却液  
5 被循环通过热交换线圈，以降低冷却度的温度。较佳的是，连续执行步骤 310、320、330 和 335，直到冷却液的温度达到最佳的温度范围。

用于冷冻生物材料的冷却液的温度是本发明至少一个实施例的重要要素。为了使用常规的方法获得玻璃化，通常用液氮在-196℃的温度使生物材料骤冷。在非常短的时间内如此急剧的温度变化使细胞结构内的水非常快地冷冻，以至于这些水  
10 没有机会形成冰晶。但是，采用在液氮中骤冷的方法冷冻生物材料可能导致细胞膜内的应力破坏，从而限制了在液氮中骤冷在低温保藏中的应用。由于在本发明的优选实施方案中采用的温度范围是-20℃到-30℃，所以由温度变化引起的应力破坏减少到最小程度，可实现玻璃化而对细胞膜的损伤少得多。

在冷却液被冷却至适当的温度时，在步骤 305 中可化学制备要冷冻的生物材  
15 料。应理解的是，用于病理学的材料一般不需要化学制备，通过将要冷冻的材料直接浸入冷却液的上述步骤 305 与这里可达的内容一致。如先前所述，生物材料包括但不限于存活的单细胞、组织和器官、核酸和其它生物活性分子。生物材料不具有种特异性。化学制备生物材料可包括用增加细胞存活的制剂(稳定剂)除去细胞生长或死亡过程中分泌的有害物质而对其进行的预处理。有用的稳定剂包括本领域熟练  
20 的技术人员已知的那些化学品和化学化合物，这类化合物以高度反应性螯合并破坏诸如氧自由基之类的分子。

化学制备的生物材料还可包括适应步骤(未阐述)。在预处理期间或之后的某个时间，使要保藏的生物材料适应低于培养温度但仍高于冷冻温度的温度。这可通过  
25 延迟细胞代谢和减少快速的温度变化的冲击而有助于制备用于低温保藏过程的生物材料。但是，应很好地注意，为了实施本发明，适应步骤不总是需要的。

在一个优选的实施例中，用于冷冻的化学制备的生物材料包括在生物材料中加入低温保护剂。加料通常涉及生物材料在一种或多种低温保护剂中的平衡。可将  
30 在加料期间使用的物质称为填充剂。有用的填充剂包括一种或多种脱水剂、通透剂(permeating agent)或非通透剂以及渗透剂(osmotic agent)。可使用通透剂如 DMSO 和乙二醇，和通透性与非通透性渗透剂如果糖、蔗糖或葡萄糖、山梨糖、甘露糖或甘油的组合。应理解，可使用与本发明的目的一致其它合适的低温保护剂。

在冷却液达到正确的温度后，进行步骤 315，将化学制备的生物材料浸入冷却

液中。如先前所述，可将生物材料装在一个容器中，或者直接放在该冷却液中，然后进行该方法的步骤 337，使用如浸没的马达/推进器装置或泵以先前所讨论的速率将冷却液环流通过浸入的生物材料。随着冷却液流过生物材料，从比冷却液的温度高的生物材料中除去热量，这些热量被转移到用来去输送热量远离要冷冻的生物材料的冷冻液中。根据本发明的至少一个实施例，为了冷冻以玻璃化方式制备的生物材料，应维持冷却液以基本上恒定的环流通过要冷冻的生物材料。

在冷却液环流通过要冷冻的生物材料之后进行步骤 339。步骤 339 根据需要调整冷却液的速率，以适应冷却液的粘度、温度等的变化。较佳的是，通过调整一个或多个循环器提供的力使冷却液的速率维持恒定。一旦生物材料达到所需的冷冻状态，就如步骤 340 所示将其除去。在步骤 340 中用上面讨论的方法从冷却液中除去所述材料后，可将其切片并解冻以用于组织学、超微结构和免疫组织化学检查，如荧光标记的抗体染色。

图 3 中阐述的步骤按顺序进行了显示和讨论。但是，所阐述的方法中的一些或全部步骤都是连续进行的，也可以以不同的顺序进行。例如，本发明至少一个实施例使用单个循环马达使冷却液循环。在这个实施例中，冷却液与步骤 310 一样，被循环通过热交换线圈，同时也与步骤 337 一样循环通过要保藏的生物材料。此外，本发明的一个实施例连续测量冷却液的温度、粘度和其它液体特征，并在系统内的多个位点中测量。

在又一实施例中，没有直接测量冷却液的一些特性。而是由循环马达的旋转速度间接测定了冷却液特性的变化。如果马达以较低速率运转，则可给马达提供附加的动力，以使其转到所需的旋转速度，从而弥补冷却液特性的改变。在至少一个实施例中，马达被设置成维持基本上恒定的旋转速率。这个基本上恒定的旋转速率将产生基本上恒定的冷却液循环速率。

进行了本发明一个实施例的一个测试，其中，在分度容器中冷冻 5ml 的水。在冷冻后，总体积有小于 1% 的增加，比采用常规的冷冻所预期的体积要小得多。在另一测试中，在常规的冷冻机和在本发明优选方法的冷却系统中将冰冷冻成层状。在冷冻后，在暗视野显微镜下检测冰。如所预期的，常规的冰显示出晶体模型，而根据本发明的原理冷冻的冰没有光移位，这表明有少量到没有冰晶形成。

现在参照图 4，其中比较了用来比较各种低温保藏法的实验结果。柱形图 400 将通过使用四种不同的低温保藏法 B、C、D 和 E 得到的受损细胞数与对照组 A 进行比较。未对对照组 A 进行低温保藏，方法 B 使用常规的冷冻机将细胞冷冻到 $-20^{\circ}\text{C}$ ，方法 C 使用超低温冰箱将细胞冷冻到 $-80^{\circ}\text{C}$ ，方法 D 使用液氮将细胞冷冻到 $-196^{\circ}\text{C}$ ，

方法 E 使用本发明的优选实施方案将细胞冷冻到 $-25^{\circ}\text{C}$ 。

显示在柱形图 400 中的试验结果使用了用上述常规方法以及本发明例举的方法冷冻的植物组织(无籽葡萄)，它未经任何形式的制备或低温保护剂。然后将冷冻的植物组织解冻，切成薄的切片，不染色并用相差显微镜检验。实验中采用了植物组织，这是由于因冰晶形成造成的组织变形或冷冻造成的水膨胀会破坏组织的细胞壁结构，且这是容易观察的。如图 4 所示，此结果清楚显示了本发明优选实施方案的方法的优越性。正如所料，对照(A)没有显示出细胞损伤。方法 B( $-20^{\circ}\text{C}$ 冰箱)显示有约 45%的细胞壁结构损伤；方法 C( $-80^{\circ}\text{C}$ 冰箱)显示有约 55%的细胞壁结构损伤；方法 D(液氮)显示有约 59%的细胞壁结构损伤。然而，按本发明优选的实施方案进行的方法仅显示有约 12.5%的细胞壁结构损伤。

从图 5 中还可见按照优选实施方案进行的方法的优越性，图 5 是通过相差显微镜观察到的视野，它显示了在用液氮法以及本发明优选实施方案的冷冻法进行冷冻-解冻循环处理后，非低温保护的葡萄组织的形态学外观。注意在图 5 中，与用液氮法冷冻-解冻循环处理的组织相比，在按照优选实施方案进行的冷冻-解冻方法中观察到的说明细胞壁损伤的组织改变的形式和结构明显较少。

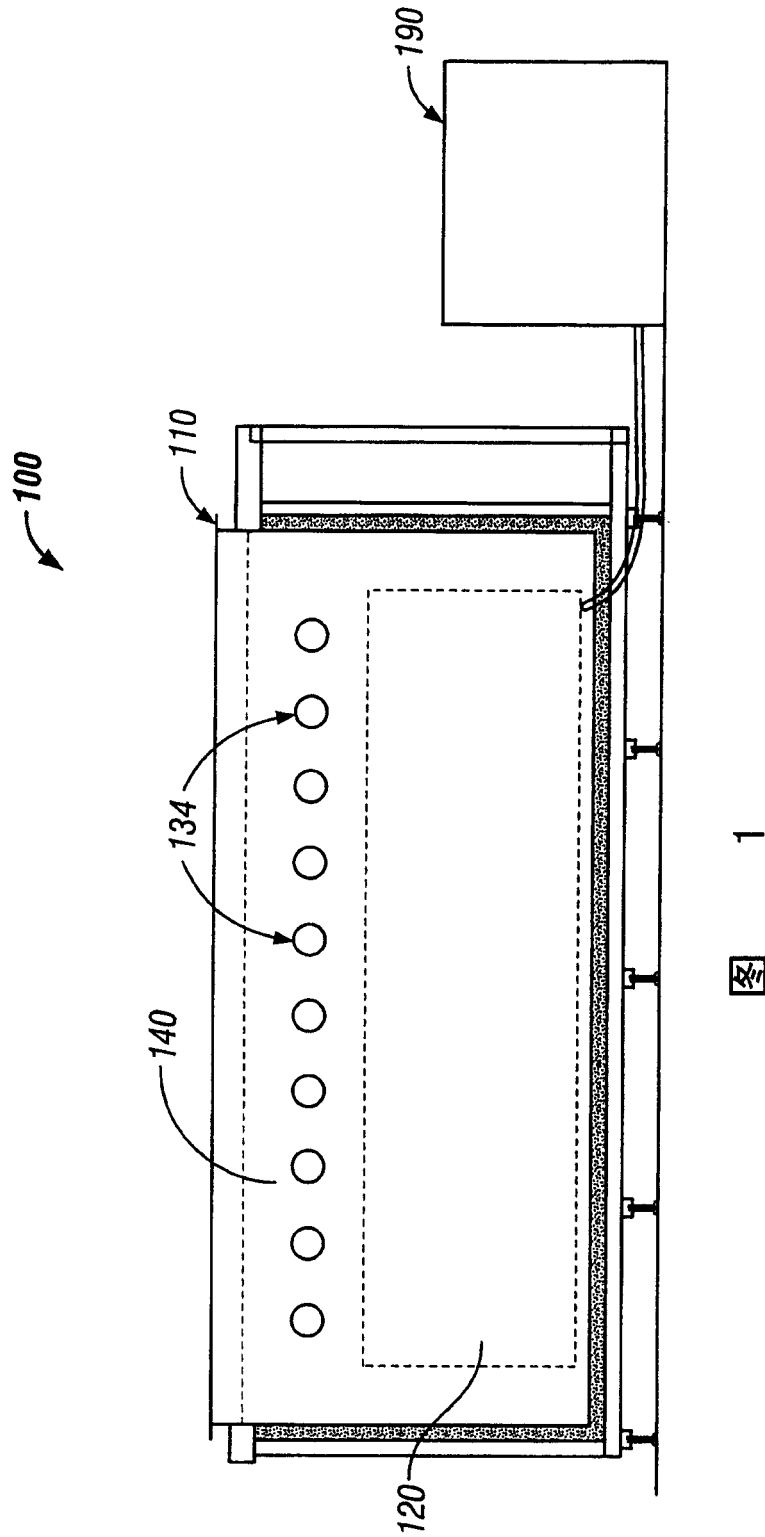
现在参照图 6，它是通过显微镜观察到的视野，显示了在用标准低温制备技术以及本发明优选实施方案的方法冷冻后，心脏组织的形态学外观。图 6 列举了死后从小鼠和犬类尸体收集的组织样品上进行的不同实验的结果。组织样品收集自五种器官：卵巢、心脏、肝脏、肾脏和肺。用标准冷冻技术和按照本发明优选实施方案的方法进行的冷冻处理制备用于常规组织学、低温切片或超微结构检查的组织。然后由经过训练的临床病理学家评价所得切片。如所预料的，未冷冻过的样品在组织学评价上有最好的形态。然而，病理学家声称，按照本发明优选实施方案的方法冷冻的组织至少与用标准低温技术处理的组织保藏的一样好，尤其是几种类型的组织，最值得注意的是肾脏和肌肉(心脏)证实，当按照本发明例举方法进行冷冻时组织完整性明显改善。图 6 清楚说明，标准低温制备技术有许多人为构造，比如，与用本发明例举方法处理的心肌样品相比，在心肌样品中观察到了“褶皱折叠”605。

现在参照图 7，其中的电子显微镜的视野显示了与未冷冻的对照相比，采用本发明优选实施方案的方法后看到的复杂的超微结构特征，如细胞线粒体 705。图 7 中列举的电镜视野清楚显示了微小差别，如果用本发明优选实施方案的方法冷冻处理的组织和未冷冻的对照组织之间有任何差别的话。此外，通过检查可以发现，与那些用本发明优选实施方案的方法冷冻的组织相比，用液氮或机械冷冻(未阐述)等标准技术冷冻的组织有明显较多的损伤。

如上所述，用现有技术制造的冷冻切片的主要问题在于冷冻后特定化学反应的损失。这种活性的损失使得这些样品对于基于抗体染色的现代免疫组织化学技术基本上是无用的。一项用荧光标记抗体(5.1H11，一种肌肉特异的人 NCAM)进行的实验证实，当按照本发明优选实施方案的方法制备时，预先用这种抗体染色以显示5 荧光的原代猪卫星细胞在冷冻后继续发出荧光。然而，在液氮中冷冻的细胞在解冻后却不发出荧光。这一实验结果说明，优选实施方案的方法使这项低温病理学和免疫组织化学的新技术可用于研究和患者护理领域。

由于本发明可以冷冻生物材料使所述材料玻璃化，细胞膜中应力破坏的形成被最小化，且冷冻后细胞内的化学活性没有损失，所以本发明的各种实施例可应用于具有正确化学制备的其它医学领域如皮肤移植、角膜保存、循环血管保存、移植10 组织的冷冻、不育治疗以及分子变性疾病(癌症)的研究。

尽管这里已经显示并详细描述了本发明的一个实施方案以及它的某些变化，但那些本领域熟练技术人员可以容易地建立许多其它的包含本发明内容的各种实施方案。因此，本发明不打算限于这里规定的特殊形式，相反，这种可供选择的方法、修改和等价物也合理地包含在本发明的精神和范围内。15



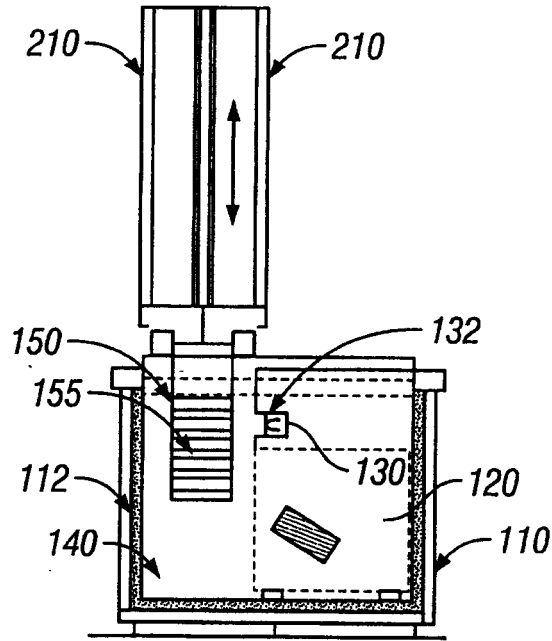
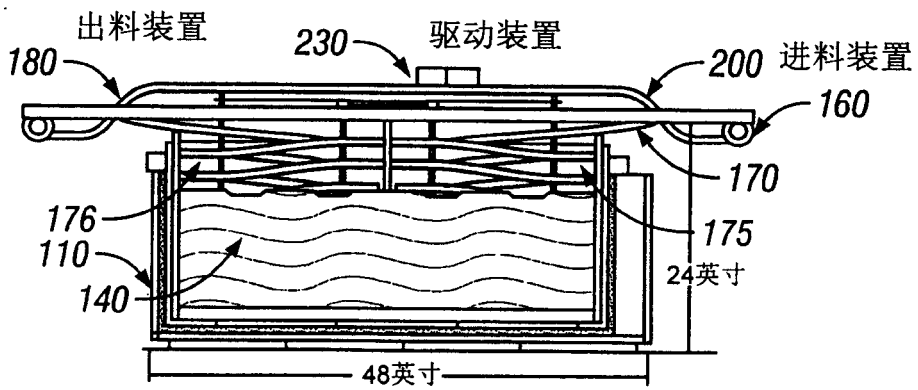


图 2



多层螺旋途径输送机系统

图 2A

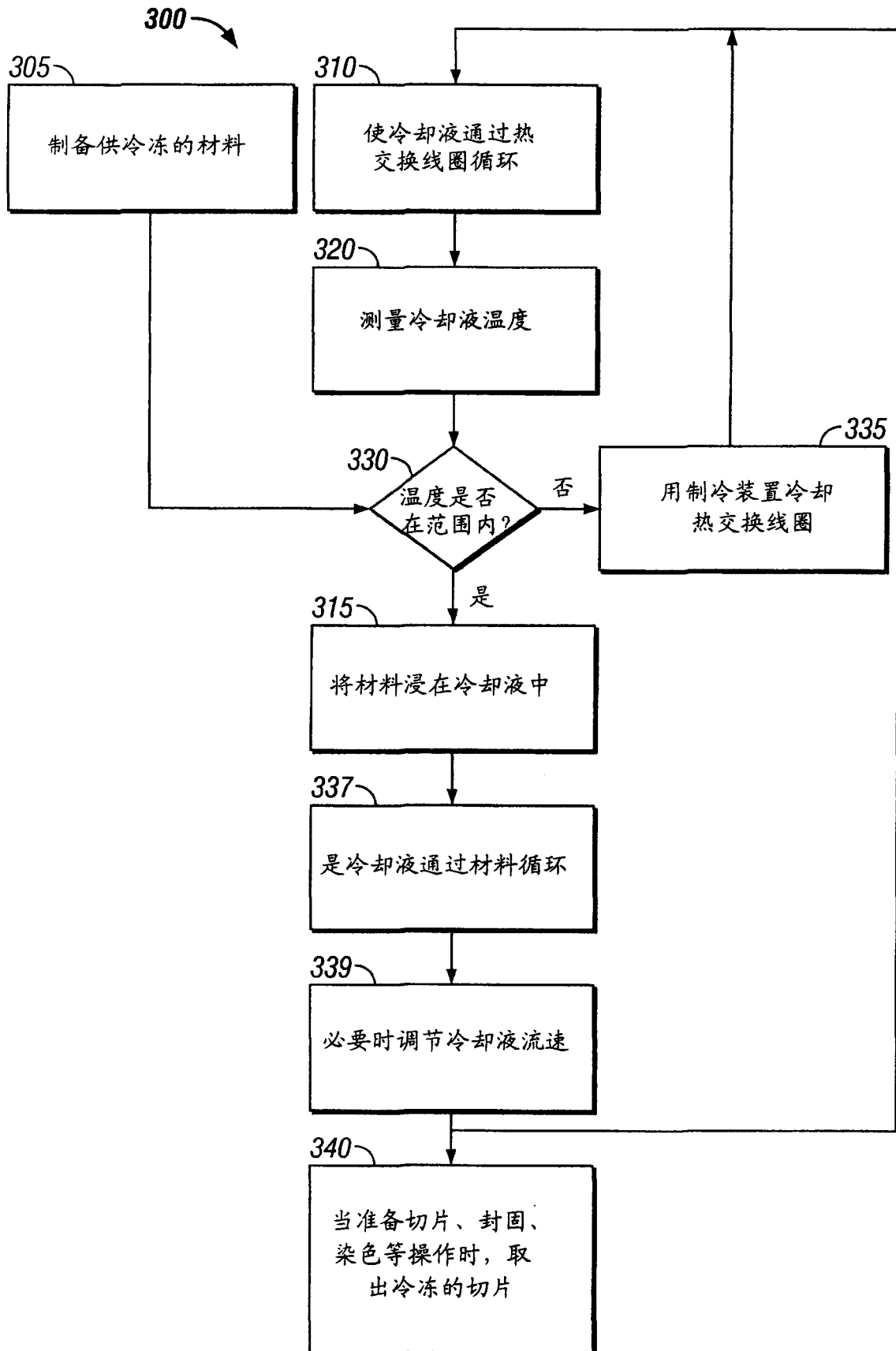


图 3

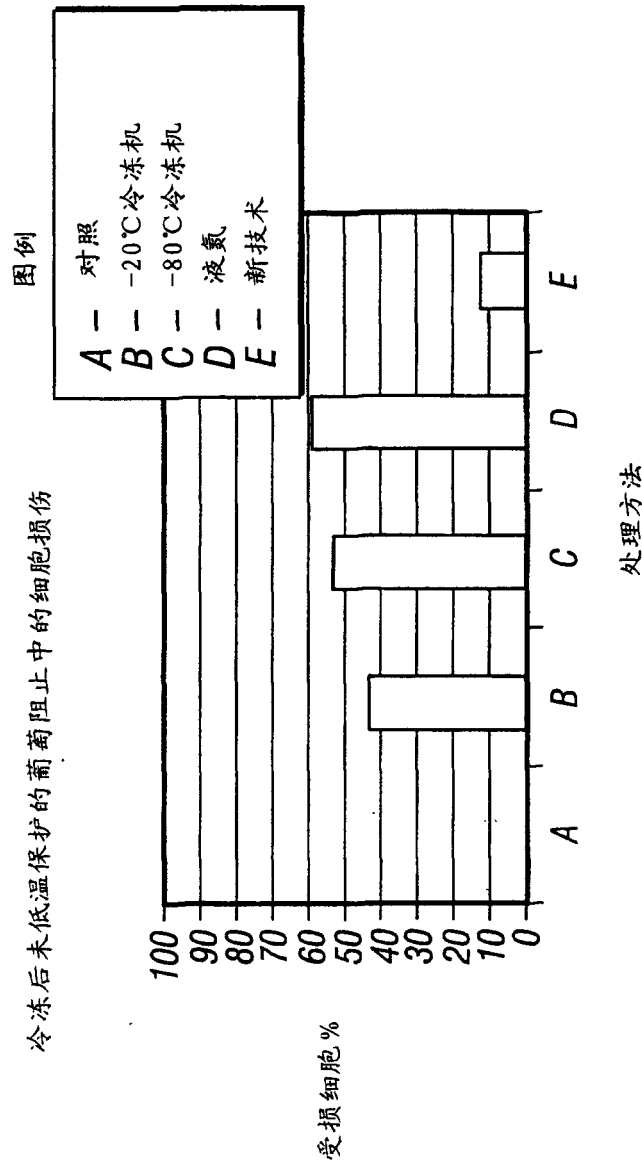


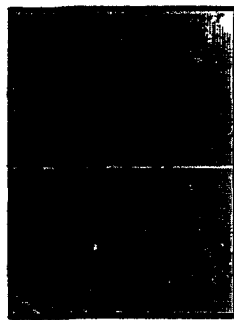
图 4



液氮

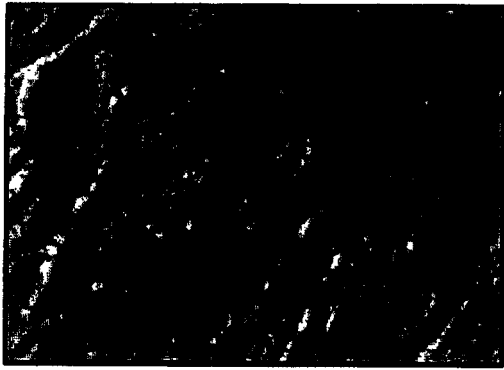


新技术

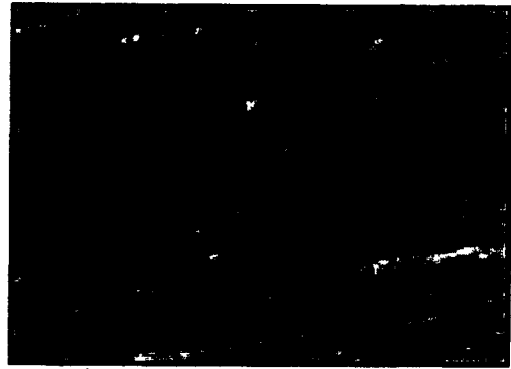


对照

图 5

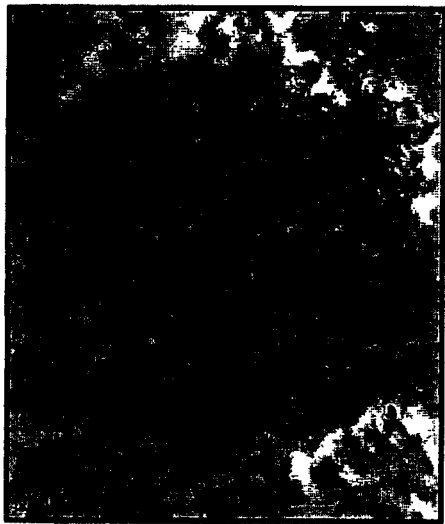


标准低温制备技术

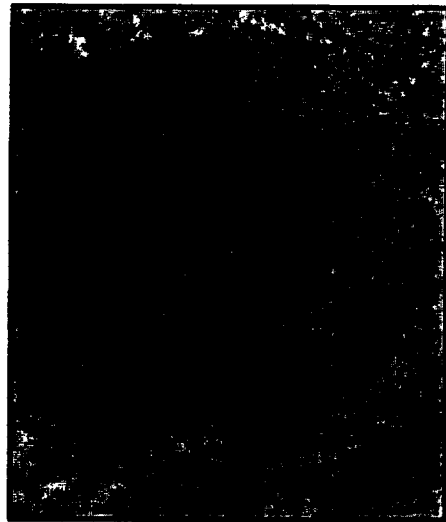


新系统

图 6



对照, 未冷冻



新系统

图 7

专利名称(译)	为组织学和病理学检验制备组织样品的方法和系统		
公开(公告)号	<a href="#">CN1685210A</a>	公开(公告)日	2005-10-19
申请号	CN01821674.9	申请日	2001-12-28
[标]发明人	SD普里恩 J布兰顿 B伍德 AJ卡斯尔		
发明人	S·D·普里恩 J·布兰顿 B·伍德 A·J·卡斯尔		
IPC分类号	G01N33/48 A01N1/02 F25D25/00 F25D31/00 G01N1/28 G01N1/42 G01N33/53 A01N1/00 F25D17/02		
CPC分类号	F25D2400/30 F25D31/003 A01N1/02 A01N1/0257 G01N1/42 F25D25/00		
代理人(译)	周承泽		
优先权	60/259418 2001-01-02 US		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

通过将材料浸入装有冷却液的容器中、并以基本上恒定的预定速率和温度使冷却液环流通过该材料以冷冻此材料，从而将存活的生物材料进行低温保藏(低温保存)。所述材料可以无需制备直接浸入冷却液，或在冷冻之前进行化学制备。本发明的方法以足够快的速率冷冻生物材料，以避免在细胞结构内形成冰晶(玻璃化)，并可使样品保持解剖学结构且在解冻后仍有生化活性。冷却液的温度较佳为 - 20°C到 - 30°C，这个温度范围足够使细胞膜中由于热变化而导致的应力破坏的形成和其它人为构造减少到最小程度。与病理学和组织学技术所用的其它低温保存法冷冻的细胞相比，采用本发明方法冷冻的细胞具有明显较小的细胞和细胞内损伤。由于本发明可冷冻生物材料，这样材料被玻璃化，故冷冻后细胞内的生化活性未受损失，因此本发明的各种实施方案可用于系统，以为制备生物材料值这项低温病理学和免疫组织化学的新技术用于研究和患者护理领域。

