

说明书

一种仿生控冰材料及含有该仿生控冰材料的冷冻保存液

本申请要求 2019 年 4 月 9 日向中国国家知识产权局提交的专利申请号为 2019102824189、2019102824225、2019102824174、201910282416X、2019102819867 的在先申请的优先权。前述在先申请的全文通过引用的方式结合于本申请中。

技术领域

本发明属于生物医用材料技术领域，具体涉及一种仿生控冰材料及含有该仿生控冰材料的冷冻保存液。

背景技术

冷冻保存是指将生物材料保存于超低温状态下，使细胞新陈代谢和分裂速度减慢或者停止，一旦恢复正常生理温度又能继续发育。该技术自问世以来，成为自然科学领域不可缺少的研究方法之一，已被广泛采用。近年来，随着生活压力的增加，人类生育力呈逐年下降的趋势，生育力保存越来越受到人们的重视，人类生殖细胞(精子、卵母细胞)、性腺组织等的冷冻保存就成为保存生育力的重要手段。另外，随着世界人口老龄化加剧，对捐赠的可用于再生医学和器官移植的人源性细胞、组织或器官的冷冻保存的需求也极速增加。因此，如何高效的冷冻保存珍贵的细胞、组织以及器官资源以备不时之需成为亟待解决的科学技术问题。

目前最常用的冷冻保存方法为玻璃化冷冻。玻璃化冷冻技术采用渗透性或非渗透性低温保护剂，虽然在快速冷冻过程中可使细胞内外的液体直接成为玻璃态而避免了冷冻过程中因冰晶形成而导致的损伤。但是，在复温过程中，现有的冷冻保存试剂不能有效的控制冰晶的生长，从而损害细胞。由于抗冻蛋白和仿生控冰材料在分子层面的控冰机制仍有争议，仿生控冰材料的研发只能依赖“试误法”逐步尝试某种控冰材料的控冰效果，工作量大，成功几率低。目前常用的冷冻保存试剂不具备复温过程中有效控制冰晶生长的能力，而且试剂毒性大。

发明内容

为改善现有技术的上述缺陷，本发明提供一种仿生控冰材料的分子设计方法和控冰材料的筛选方法，可以指导人们有目的的合成和筛选仿生控冰材料，本发明还提供了基于该方法得到的仿生控冰材料以及含有这些材料的冷冻保存试剂。

本发明提供以下技术方案：

本发明的第一方面，提供一种控冰材料的分子设计方法，包括如下步骤：

- (1) 构建化合物分子结构库，所述化合物分子含有亲水基团和亲冰基团；
- (2) 采用分子动力学模拟(Molecular dynamics simulation, MD)，模拟评估各化合物分子在冰水两相界面的铺展性能；
- (3) 根据步骤(2)筛选出所需冰亲和性和水亲和性的控冰分子。

根据本发明，所述控冰分子的主链为碳链或者肽链结构。

根据本发明，所述亲水基团为可与水分子形成非共价作用的官能团，例如可与水形成氢键、范德瓦尔斯作用、静电作用、疏水作用或者 π - π 作用等；示例性地，所述亲水基团可以选自羟基(-OH)、氨基(-NH₂)、羧基(-COOH)、酰胺基(-CONH₂)等中的至少一种，或，例如选自脯氨酸(L-Pro)、精氨酸(L-Arg)、赖氨酸(L-Lys)等亲水氨基酸，葡萄糖酸内酯(GDL)，糖类等化合物或其分子片段。

根据本发明，所述亲冰基团为可与冰形成非共价作用的官能团，例如可与冰形成氢键、范德瓦尔斯作用、静电作用、疏水作用或者 π - π 作用等；示例性地，所述亲冰基团可以选自羟基(-OH)，氨基(-NH₂)，苯基(-C₆H₅)，吡咯烷基(-C₄H₅N)，或，例如选自谷氨酰胺(L-Gln)、苏氨酸(L-Thr)、天冬氨酸(L-Asn)等亲冰氨基酸，苯环(C₆H₆)，吡咯烷(C₄H₉N)等化合物或其分子片段。

根据本发明，所述控冰材料可以为亲水基团与亲冰基团通过共价键键合而成。

根据本发明，所述控冰材料可以为亲水基团与亲冰基团通过非共价键，如：离子键作用而成。

根据本发明，所述方法还包括步骤(4)：合成所述控冰分子(控冰材料)的步骤，例如可通过已知的化学合成方法，例如聚合反应、缩合反应，或者基因工程菌生物发酵等方法合成。

本发明还提供根据第一方面所述分子设计方法所得的控冰材料。

本发明的第二方面，提供一种筛选控冰材料的方法，包括如下步骤：(a)测得控冰材料与水的亲和性；(b)测得所述控冰材料在冰水界面的铺展性能。

作为本发明的实施方案，所述步骤(a)可以通过测定所述控冰材料在水中的溶解度、水合常数、分散尺寸、扩散系数等、和/或计算所述控冰材料与水分子形成的分子间氢键数等方法测定；具体地，例如采用分子动力学模拟(Molecular dynamics simulation, MD)测定所述控冰材料分子与水分子形成的分子间氢键数，或者采用动态光散射测定所述控冰材料在水溶液中的分散尺寸。

作为本发明的实施方案，所述步骤(b)可以通过测定在冰水界面处所述控冰材料在冰表面的吸附含量得到所述材料在冰水界面的铺展性能，和/或计算所述控冰材料与冰-水分子形成的分子间氢键数等方法测定所述材料与冰的亲和性；具体地，例如采用MD模拟测定所述控冰分子与冰-水分子形成的分子间氢键数，或者采用冰吸附实验于冰水界面处测得所述控冰材料分子在冰表面的吸附量。

根据本发明，所述冰吸附实验包括测得所述控冰材料在冰表面的吸附量。

根据本发明，所述控冰材料在冰表面的吸附量=(冰表面所吸附的控冰材料质量 m_1 /含有控冰材料的原溶液中控冰材料的总质量 m_2) $\times 100\%$ 。

作为本发明的实施方案，所述冰吸附实验包括以下步骤：

S1: 取质量为 m_2 的控冰材料，配制所述控冰材料的水溶液，降温至过冷温度；

S2: 将预冷的控温棒置于所述水溶液中诱导冰层在控温棒表面生长，持续搅拌水溶液，以待控冰材料逐渐吸附于冰层表面，保持水溶液、控温棒温度在过冷温度；

S3: 测定控冰材料在冰表面的吸附量 m_1 。

根据本发明的实施方案，所述控温棒为导热材料制得的棒状物。所述棒状物可以是实心的或者中空的。当所述控温棒为中空时，其中空内腔有冷却液流动，可以通过控制冷却液的温度控制控温棒的温度，从而控制冰块的生长速度。

根据本发明的实施方案，所述控温棒可经液氮、干冰、超低温冰箱冷冻等方式中的一种预冷。

根据本发明的实施方案，所述冰吸附实验过程中，保持过冷度以及吸附时间不变以使控温棒表面所得冰的表面积在误差允许范围内保持不变。

根据本发明的实施方案，配置不同浓度的控冰材料的水溶液，进行冰吸附实验，可以评估同一控冰材料在具体应用时的适用浓度范围。

根据本发明的实施方案，所述步骤 S1 中控冰材料可以为预先荧光标记的，例如用荧光素进行标记，所述荧光素可以选自异硫氰酸荧光素(FITC)、四乙基罗丹明(RB200)、四甲基异硫氰酸罗丹明(TRITC)、碘化丙啶(PI)等中的至少一种。本领域技术人员应当理解，所述荧光标记的作用在于测得所述控冰材料的量，因此，如果所述控冰材料的吸附量可以通过其他方式准确测量，或者材料本身具有紫外或荧光光谱吸收特性，则无需进行荧光标记。

根据本发明的实施方案，步骤 S3 包括：

S3a: 将吸附完成的冰块取出，纯水淋洗冰表面，融化冰块得到控冰材料吸附溶液；

S3b: 测定融化的控冰材料吸附溶液的体积 V ，测定所述吸附溶液中控冰材料的质量/体积浓度 c ，通过公式 $m_1=cV$ 计算得到冰表面所吸附的控冰材料质量 m_1 。

根据本发明的实施方案，所述 S3b 中，所述浓度 c 可通过本领域已知的方法测得，例如紫外可见光谱法、荧光光谱法等。

根据本发明，所述方法用于控制冰晶生长材料的筛选，例如 PVA、聚氨基酸、抗冻蛋白、多肽等。

根据本发明，所述方法在步骤(a)和/或(b)之后还包括步骤(c)：评估所述材料与水的亲和性和在冰水界面的铺展性能，铺展能力强的材料具有良好的控冰性能。

作为本发明步骤(c)的一个具体评估方案，覆盖一定冰表面积所需控冰材料的用量越小，则说明其铺展性能越好，即满足铺展系数 $S > 0$ ，其中 $S = \gamma_{I-W} - (\gamma_{I-I} + \gamma_{I-I-W})$ ， γ_{I-W} 为常数，即，冰水界面能 γ_{I-W} 大于材料与冰以及材料与水的界面能之和 $\gamma_{I-I} + \gamma_{I-I-W}$ (γ_{I-I} : 材料与冰的界面能； γ_{I-I-W} : 材料与水的界面能)。

本发明中，过冷温度是指低于水的凝固点但仍不凝固或结晶的温度，在室温 25°C 时，所述过冷温度一般在 -0.01°C ~ -0.5°C 范围内，例如 -0.1°C 。本发明还提供一种冰吸附实验装置，包括多层储液腔、控温棒和温度控制器，所述多层储液腔由里到外依次包括冰吸附腔、温浴腔、冷却液储存腔，所述控温棒置于冰吸附腔内，所述控温棒和储液腔的温度由温度控制器控制。

根据本发明的冰吸附实验装置,所述控温棒为导热材料制成的中空结构,所述控温棒的中空结构设置有进液口和排液口;所述温度控制器为流体温控器,所述温度控制器设置有冷却液流出端和回流端;所述冷却液储存腔两端设置有进液口和排液口;所述温度控制器的冷却液流出端、控温棒的进液口、控温棒的排液口、冷却液储存腔的进液口、冷却液储存腔的排液口以及温度控制器的回流端依次经管道连通,所述管道内流动冷却液。

根据本发明的冰吸附实验装置,所述多层储液腔设有盖子。

使用时,所述冰吸附腔内盛放控冰材料的水溶液,中层温浴腔装有预定温度的温浴介质例如水浴、冰浴或者油浴等;冷却液温度达到设定温度后,经温度控制器流出,流入中空的控温棒中空结构,对控温棒温度实现控制,随后从控温棒排液口流出,再流入外层冷却液储存腔保持温浴介质的温度在预定水平,再经冷却液储存腔的排液口流经温度控制器的回流端进入温度控制器循环。

本发明的控冰材料的分子设计方法和控冰材料筛选方法,可以彼此独立地进行,也可以结合进行。在一个实施方案中,本发明提供一种设计和筛选控冰材料的全流程方法,依次包括:第一方面所述的分子设计步骤、第二方面所述的筛选控冰材料的步骤。

具体来说,所述方法包括如下步骤:

- (1) 构建化合物分子结构库,所述化合物分子含有亲水基团和亲冰基团;
- (2) 采用分子动力学模拟(Molecular dynamics simulation, MD),模拟评估各化合物分子在冰水两相界面的铺展性能;
- (3) 根据步骤(2)的结果筛选出所需冰亲和性和水亲和性的控冰分子;
- (4) 合成筛选出的具有冰亲和性和水亲和性的控冰分子(控冰材料);
- (5) 测得控冰材料与水的亲和性;
- (7) 测得所述控冰材料在冰水界面的铺展性能。

根据本发明的技术方案,所述步骤(7)之后包括进一步评估所述铺展性能的步骤(c),评估所述材料与水的亲和性和在冰水界面的铺展性能,铺展能力强的材料具有良好的控冰性能。

作为本发明步骤(c)的一个具体评估方案,覆盖一定冰表面积所需控冰材料的用量越小,则说明其铺展性能越好,即满足铺展系数 $S > 0$,其中 $S = \gamma_{I-W} - (\gamma_{I-R-I} + \gamma_{I-R-W})$, γ_{I-W} 为常数,即,冰水界面能 γ_{I-W} 大于材料与冰以及材料与水的界面能之和 $\gamma_{I-R-I} + \gamma_{I-R-W}$ (γ_{I-R-I} :材料与冰的界面能; γ_{I-R-W} :材料与水的界面能)。

根据上述分子设计方法和筛选方法,本发明的发明人发现羟基立构规整度对聚乙烯醇 PVA 控制冰晶生长能力存在影响,并进一步发现一种特定间同规整度的聚乙烯醇(PVA)具有非常优异的控制冰晶生长的能力,所述 PVA 间同规整度(diad syndiotacticity) r 为 45%~60%,分子量为 10 kDa - 500 kDa;优选地,所述 PVA 间同规整度 r 为 50%~55%,分子量为 10-30 kDa。

本发明的发明人还设计并合成了多种肽类化合物,例如二肽、三肽、类肽、糖肽化合物,具有非常优异的控制冰晶生长的能力。

所述肽类化合物由亲冰性氨基酸,如:苏氨酸(L-Thr)、谷氨酰胺(L-Gln)、天冬氨酸(L-Asn)等与其他亲水性氨基酸或葡萄糖内酯(GDL)或糖类反应得到,所述其他亲水性氨基酸可选自精氨酸、脯氨酸、丙氨酸等。所述肽类化合物为含有亲冰基团的氨基酸和含有亲水基团的氨基酸组成。在一个实施方案中,组成所述肽类化合物的氨基酸为两种以上的氨基酸,或者一种以上氨基酸与葡萄糖内酯或糖类。

本发明还发现一些特定的氨基酸或者聚氨基酸具有非常优异的控制冰晶生长的能力。

所述氨基酸为含有亲冰基团和亲水基团的氨基酸,所述聚氨基酸为氨基酸均聚物,例如所述氨基酸选自精氨酸、苏氨酸、脯氨酸、赖氨酸、组氨酸、谷氨酰胺、天冬氨酸、甘氨酸等氨基酸的均聚物;优选聚合度为 2-40,更优选聚合度为 2-20,例如聚合度为 6、8、15、20 等,例如为聚-L-脯氨酸、聚-L-精氨酸等中的一种或两种以上的组合。

示例性地,所述氨基酸选自精氨酸、苏氨酸、脯氨酸、赖氨酸、组氨酸、谷氨酰胺、天冬氨酸、甘氨酸等中的一种或两种;例如为精氨酸与苏氨酸的组合。

本发明的第三方面,提供一种冷冻保存液,包括如第一方面的方法所设计的控冰材料,或者第二方面所述方法筛选的控冰材料。在一个实施方案中,所述控冰材料为聚乙烯醇(PVA),氨基酸或聚氨基酸,和/或肽类化合物的一种或几种的组合;所述冷冻保存液还包括多元醇、水溶性糖(或其衍生

物, 如水溶性纤维素) 和缓冲液。

在一个实施方案中, 所述冷冻保存液包括肽类化合物, 以每 100 mL 冷冻保存液计, 含有 0.1-50 g 所述肽类化合物, 0-6.0 g 的 PVA, 0-9.0 g 的聚氨基酸, 0-15 mL 的 DMSO, 5-45 mL 的多元醇, 0.1-1.0 mol L⁻¹ 的水溶性糖, 0-30 mL 的血清, 余量为缓冲液。

在一个实施方案中, 所述冷冻保存液包括聚乙烯醇, 以每 100 mL 冷冻保存液计, 含有 PVA 0.01-6.0g, 0-50 g 所述肽类化合物, 0-9.0 g 的聚氨基酸, 0-15 mL 的 DMSO, 5-45 mL 的多元醇, 0.1-1.0 mol L⁻¹ 的水溶性糖, 0-30 mL 的血清, 余量为缓冲液。

在一个实施方案中, 所述冷冻保存液包括氨基酸或聚氨基酸, 以每 100 mL 冷冻保存液计, 含有 0.1-50 g 的氨基酸或聚氨基酸, 0-6.0 g 的 PVA, 0-15 mL 的 DMSO, 5-45 mL 的多元醇, 0.1-1.0 mol L⁻¹ 的水溶性糖, 0-30 mL 的血清, 余量为缓冲液。根据本发明, 每 100 mL 冷冻保存液中所述氨基酸和/或聚氨基酸含量为 0.5-50 g, 优选 1.0-35g, 例如, 当含有氨基酸时, 其含量可以为 5.0-35g, 优选为 15-25g; 当含有聚氨基酸时, 其含量可以为 0.5-9.0g, 优选为 1.0-5.0g。

根据本发明, 所述多元醇可以为碳原子数为 2-5 的多元醇, 优选碳原子数 2-3 的二元醇、和/或三元醇, 例如乙二醇, 丙二醇, 丙三醇中的任一种; 优选乙二醇。

根据本发明, 所述水溶性糖可以为非还原性双糖、水溶性多糖、水溶性纤维素、糖酐中的至少一种, 例如选自蔗糖、海藻糖、羟丙基甲基纤维素、聚蔗糖; 优选蔗糖。所述水溶性糖可以起到保护细胞膜和避免细胞沉降的作用。

根据本发明, 所述缓冲液可选自 DPBS 或 hepes-buffered HTF 缓冲液, 或其他细胞培养缓冲液中的至少一种。

根据本发明, 所述血清针对人源性冷冻保存对象可选人血清白蛋白或其替代物, 例如十二烷基磺酸钠, 针对非人源性冷冻保存对象可选胎牛血清或牛血清白蛋白。

根据本发明, 每 100 mL 冷冻保存液中所述 DMSO 含量为 0-10 mL, 优选 DMSO 含量为 1.0-7.5 mL, 例如 1.5-5 mL; 作为本发明的另一实施方案, 每 100 mL 冷冻保存液中所述 DMSO 含量为 0。

根据本发明, 每 100 mL 冷冻保存液中所述血清含量为 0.1-30 mL, 例如 5.0-20 mL, 10-15 mL; 作为本发明的另一实施方案, 每 100 mL 冷冻保存液中所述血清含量为 0。

根据本发明, 每 100 mL 冷冻保存液中所述水溶性糖含量为 0.1-1.0 mol L⁻¹, 例如 0.1-0.8 mol L⁻¹, 0.2-0.6 mol L⁻¹; 具体地, 例如 0.25 mol L⁻¹, 0.5 mol L⁻¹, 1.0 mol L⁻¹。

根据本发明, 每 100 mL 冷冻保存液中所述多元醇, 含量为 5.0-40 mL, 例如 6.0-20 mL, 9-15 mL。

根据本发明, 所述冷冻保存液的 pH 为 6.5-7.6, 例如为 6.9-7.2。根据本发明, 所述肽类化合物或氨基酸、聚氨基酸具有上文所述的含义。

根据本发明, 所述 PVA 选自等规 PVA、间规 PVA 和无规 PVA 的一种或两种以上的组合, 例如所述 PVA 的间同规整度为 15 %-65 %, 具体地例如 40 %-60 %、53 %-55 %。优选无规 PVA, 例如所述 PVA 的间同规整度为 45 %-65 % 的 PVA。

根据本发明, 所述 PVA 可选自分子量为 10-500 kDa 或者更高分子量的 PVA, 例如分子量为 10-30 kDa、30-50 kDa、80-90 kDa、200-500 kDa。

根据本发明, 所述 PVA 可选自水解度大于 80 % 的 PVA, 例如水解度为 80 %-99 %、82-87 %、87 %-89 %、89 %-99 %、98 %-99 %。

作为本发明的一个实施方案, 所述冷冻保存液以每 100 mL 计, 含有如下组分: 氨基酸 0.5-50 g, 多元醇 5.0-45 mL, DMSO 0-10 mL, 血清 0.1-30 mL, 水溶性糖 0.1-1.0 mol L⁻¹, 缓冲液 余量。优选: 所述冷冻保存液以每 100 mL 计, 含有如下组分: L-Arg 2.0-20 g, L-Thr 1.0-10 g, 乙二醇 5.0-15 mL, DMSO 5.0-10 mL, 血清 5.0-20 mL, 蔗糖 0.1-1.0 mol L⁻¹ DPBS 余量。

作为本发明的一个实施方案, 所述冷冻保存液以每 100 mL 体积计, 含有如下组分: 聚氨基酸 0.5-9.0 g, 多元醇 5.0-45 mL, DMSO 0-10 mL, 血清 5.0-20 mL, 水溶性糖 0.1-1.0 mol L⁻¹, 缓冲液 余量。优选: 所述冷冻保存液以每 100 mL 体积计, 含有如下组分: 聚-L-脯氨酸或聚-L-精氨酸 1.0-8.0 g, 乙二醇 5-45 mL, DMSO 0.1-10 mL, 血清 5.0-20 mL, 蔗糖 0.1-1.0 mol L⁻¹, DPBS 余量。

作为本发明的一个实施方案, 所述冷冻保存液以每 100 mL 体积计, 包括如下组分: PVA 0.01-6.0g, 多元醇 5.0-45 mL, 血清 0.1-30 mL, 水溶性糖 0.1-1.0 mol L⁻¹, 缓冲液 余量。

优选, 所述冷冻保存液以每 100 mL 体积计, 包括如下组分: PVA 0.01-6.0g, 乙二醇 5.0-30 mL,

血清 10-20mL, 蔗糖 0.1-0.6 mol L⁻¹, DPBS 余量。

作为本发明的一个实施方案, 所述冷冻保存液以每100mL体积计, 包括如下组分: , PVA 1.0-5.0g, 多元醇 5.0-20mL, DMSO 0.1-10mL, 血清 0.1-20mL, 水溶性糖 0.2-0.8 mol L⁻¹, 缓冲液 余量。优选: 所述冷冻保存液以每100mL体积计, 包括如下组分: PVA 1.0-4.0g, 乙二醇 5.0-15mL, DMSO 4-10mL, 血清 10-20mL, 蔗糖 0.2-0.6 mol L⁻¹, DPBS 余量。

作为本发明的一个实施方案, 所述冷冻保存液以每100mL体积计, 由如下组分组成: PVA 0.1-6.0g, 多元醇 10-45 mL, 水溶性糖 0.2-1.0 mol L⁻¹, 缓冲液 余量。优选: 所述冷冻保存液以每100mL体积计, 由如下组分组成: PVA 1.0-5.0g, 乙二醇 5.0-20 mL, 蔗糖 0.2-0.6 mol L⁻¹, DPBS 余量。

作为本发明的一个实施方案, 所述冷冻保存液以每100mL体积计, 含有如下组分: , 聚氨基酸 0.5-9.0 g, 多元醇 5.0-45 mL, PVA 0.1-6 g, 血清 0-20 mL, 水溶性糖 0.1-1.0 mol L⁻¹, 缓冲液 余量。优选: 所述冷冻保存液以每100mL体积计, 含有如下组分: 聚-L-脯氨酸或聚-L-精氨酸 1.0-8.0 g, 乙二醇 5-45 mL, PVA 0.1-6 g, 血清 5.0-20 mL, 蔗糖 0.1-1.0 mol L⁻¹, DPBS 余量。

本发明还提供上述冷冻保存液的制备方法, 包括如下步骤:

(1) 分别量取所述氨基酸或聚氨基酸、聚乙烯醇、肽类化合物中的任一种或多种, 分别溶解于部分缓冲液, 调节 pH 后形成溶液;

(2) 将水溶性糖溶解于另一部分的缓冲液中, 待水溶性糖全部溶解后加入除血清外的其他组分, 制得溶液;

(3) 待步骤(1)和步骤(2)的溶液冷却至室温后混合, 调节 pH 并用缓冲液定容至预定体积, 得到所述冷冻保存液。

根据本发明冷冻保存液的制备方法, 当所述冷冻保存液含有血清时, 所述血清在所述冷冻保存液使用时添加。

根据本发明的制备方法, 所述PVA溶解时, 采用温浴加热并进行搅拌, 例如采用水浴或油浴加热; 例如水浴温度为65-85°C、70-80°C; 所述搅拌为机械搅拌例如磁力搅拌。

根据本发明的制备方法, 所述水溶性糖的溶解为超声辅助溶解。

本发明的冷冻保存液可与冷冻平衡液配合使用。在一个实施方案中, 本发明提供一种冷冻平衡液, 以每100mL计, 含有多元醇5.0-45 mL, 缓冲液 余量。

根据本发明的冷冻平衡液, 还任选地包括DMSO 0-15 mL, 血清0-30mL, 和/或PVA 0-5.0 g。

根据本发明的冷冻平衡液, 所述多元醇含量为6.0-28 mL, 例如7.0-20mL, 10-15 mL。

根据本发明的冷冻平衡液, 所述DMSO含量为0.1-15mL, 例如1.0-10 mL, 5.0-7.5 mL; 作为本发明的一个实施方案, 所述DMSO的含量为0。

根据本发明的冷冻平衡液, 所述血清含量为0.1-30 mL, 例如 5.0-20mL, 10-15mL; 作为本发明的一个实施方案, 所述血清的含量为0。

根据本发明的冷冻平衡液, 所述PVA含量为0.1-5.0 g, 例如0.1 g、0.5 g、1.0 g、2.0 g; 作为本发明的一个实施方案, 所述PVA的含量为0。

本发明冷冻平衡液中, 所述多元醇、血清、缓冲液可选自与所述冷冻保存液中相同的种类。在一个实施方案中, 当所述冷冻保存液不含有血清时, 所述冷冻平衡液中加入PVA。

作为本发明的一个实施方案, 所述冷冻平衡液以每100mL计, 含有多元醇5.0-7.5 mL, DMSO 5.0-7.5 mL, 血清 10-20 mL, 缓冲液 余量。

作为本发明的一个实施方案, 所述冷冻平衡液以每100mL计, 含有多元醇7.5-15 mL, 血清 10-20mL, 缓冲液 余量。

作为本发明的一个实施方案, 所述冷冻平衡液以100 mL计, 含有 PVA 1.0-5.0 g, 多元醇 7.5-15mL, 缓冲液 余量。

本发明还提供上述冷冻平衡液的制备方法, 包括将各组分溶解于缓冲液中, 血清单独存放, 在使用时添加。

一种冷冻保存用试剂, 包括上述冷冻平衡液和上述冷冻保存液, 所述平衡液和保存液彼此独立存在。

根据本发明的冷冻保存用试剂, 当所述冷冻保存液不含有血清时, 所述冷冻平衡液中加入PVA。

具体来说, 所述冷冻保存液中DMSO含量为0时, 所述冷冻平衡液以每100mL计, 含有PVA 0-5.0

g, 多元醇 7.5-15 mL, 血清 10-20 mL, 缓冲液 余量; 所述冷冻保存液中DMSO和血清含量都为0时, 所述冷冻平衡液以每100 mL计, 含有PVA 1.0-5.0 g, 多元醇7.5-15mL, 缓冲液 余量。

本发明的上述冷冻保存液或冷冻保存平衡液或者两者的组合可用于各类细胞、组织、器官冷冻保存。各类细胞包括但不限于生殖细胞, 例如卵母细胞、精子, 各种干细胞, 例如脐带间充质干细胞; 各类组织包括但不限于卵巢组织、胚胎组织、受精卵; 各类器官包括但不限于卵巢或其他哺乳动物器官。

进一步地, 本发明提供上述冷冻保存液或者冷冻保存平衡液或者两者的组合在细胞、组织、器官冷冻保存中的应用。在一个实施方式中, 上述冷冻保存液或者冷冻保存平衡液或者两者的组合用于卵母细胞冷冻保存; 在一个实施方式中, 上述冷冻保存液或者冷冻保存平衡液或者两者的组合用于胚胎冷冻保存; 在一个实施方式中, 上述冷冻保存液或者冷冻保存平衡液或者两者的组合用于卵巢组织或卵巢器官冷冻保存; 在一个实施方式中, 上述冷冻保存液或者冷冻保存平衡液或者两者的组合用于干细胞冷冻保存。

本发明进一步提供一种细胞或胚胎的冷冻和复苏方法, 包括:

(1) 将细胞或胚胎置于本发明的冷冻保存液中, 制成细胞悬浮液, 进行冷冻;

(2) 将冷冻的细胞或胚胎放入解冻液中进行解冻复苏。

本发明所述的冷冻和复苏方法, 所述细胞或胚胎在置于冷冻保存液之前, 先放入平衡液中进行平衡。

本发明进一步提供一种干细胞冷冻保存的方法, 采用微滴法, 例如所述干细胞冷冻保存的方法包括如下步骤: 将冷冻保存液加入干细胞中, 吹打分散, 制成干细胞悬液, 将干细胞悬液置于冷冻载片上, 液氮(-196°C)冷冻保存。

根据本发明的实施方案, 冷冻保存的干细胞的解冻包括将置有干细胞的冷冻载片置于a-MEM培养基中, 37°C解冻。

根据本发明的实施方案, 所述干细胞为本领域已知的具有分化功能的各种干细胞, 例如全能干细胞、多能干细胞或者专能干细胞, 包括但不限于胚胎干细胞、各类间充质干细胞(例如脐带间充质干细胞、脂肪间充质干细胞、骨髓间充质干细胞等)、造血干细胞等。

本发明还供器官和/或组织的冷冻保存方法, 包括: 将器官和/或组织在冷冻平衡液中平衡, 然后将器官和/或组织放入冷冻保存液中, 再将器官和/或组织置于冷冻载片上, 液氮冷冻保存。

在一个实施方案中, 所述器官和/或组织为卵巢组织或者卵巢器官, 可以为卵巢组织切片或者完整的卵巢组织。

本发明中“冻存”和“冷冻保存”具有相同含义, 可互换使用, 指通过低温对某种物质或者细胞、组织、器官进行保存, 使其保持其本来的理化和/或生物活性、生理生化功能。

本发明中“控冰分子”或“控冰材料”具有相同含义, 指具有抑制水溶液中冰晶生长能力的化合物。在一个实施方案中, 所述控冰分子在冰水界面具有良好的铺展性能, 可以减小冰晶尺寸, 或者所述控冰分子不具有热滞后或具有足够小的热滞后, 可以显著减少水溶液中冰晶的形成。

有益效果

1. 本发明首次发现控冰分子在冰水混合相中控制冰晶生长的机制, 控冰材料需与冰和水均具有良好的亲和性。控冰分子与冰具有亲和性可以保证其较好的吸附在冰表面上; 分子与水具有亲和性可以确保其在冰水界面更好地铺展, 以尽可能实现用最少量的材料, 覆盖最大的冰表面积。基于这一控冰机理, 提出设计兼具亲冰性能和亲水性能的控冰分子设计思路, 为控冰材料的合成提供新方法。

2. 本发明首次将MD模拟引入到控冰材料的分子结构设计中, 通过分子动力学模拟评估所设计的控冰分子的冰亲和性和水亲和性, 预测控冰材料的控冰性能, 并可实现结构优化。

3. 本发明通过将控冰机制和MD模拟相结合的方式, 很好地解决了目前控冰材料研发过程中仅能通过“实验试误法”对现有材料进行性能分析筛选材料的局限, 提供了一种分子结构设计的新思路, 对控冰材料的开发和应用具有极大促进作用。

4. 本发明提供的冷冻保存液来源广泛, 生物相容性好, 毒性小, 安全性高, 并且大大减少DMSO的用量, 甚至不加DMSO时也能达到与现有含DMSO15%以上的商业化冷冻保存液同等甚至更高的细胞存活率。本发明的冷冻保存液组成简单, 且原料来源方便, 成本低廉, 可广泛应用于各类细胞、组织的冷冻保存, 例如可广泛用于卵母细胞、胚胎、干细胞、卵巢组织、卵巢器官等冷冻保存, 均可

保持良好的生物活性。

附图说明

图 1: 控冰材料的分子结构示意图;

图 2: MD 模拟无规立构聚乙烯醇 (a-PVA) 与全同立构聚乙烯醇 (i-PVA) 在冰水界面的聚集状态;

图 3: 实施例 1 合成的 a-PVA 的氢核磁共振谱图;

图 4: 实施例 1 合成的 PBVE 和 i-PVA 的氢核磁共振谱图, A 为 PBVE, B 为 i-PVA;

图 5: 实施例 1 合成的 PBVE 的 GPC 曲线;

图 6: DLS 实验中不同浓度时 a-PVA (A) 与 i-PVA (B) 在水中的分散尺寸;

图 7: 两种 PVA 的 PBS 溶液的冰晶生长的光学显微图片, A 为 a-PVA, B 为 i-PVA, C 为两种 PVA 的 PBS 溶液相对于 PBS 的最大冰晶尺寸与浓度关系;

图 8: a-PVA (图 A、B) 与 i-PVA (图 C、D) 在纯水中修饰冰晶形貌效果;

图 9: MD 模拟的两种 PVA 的分子结构模型;

图 10: MD 模拟的两种 PVA 分子在 240K 时在冰水界面处与水分子以及冰水分子的可接触表面积, 其中图片上部为 a-PVA 分子 3 次的结果, 下部为 i-PVA 分子 3 次的结果;

图 11: MD 模拟计算的两种 PVA 在水溶液中的聚集概率;

图 12: MD 模拟计算 240K 时两种 PVA 在水溶液中与水形成分子间氢键数目, 在冰水界面处与水分子以及冰-水分子形成的分子间氢键数目。

图 13: GDL-L-Thr (式 (6) 的化合物) 抑制冰晶生长活性的光学显微图片和冰晶尺寸大小的统计图。

图 14: GDL-L-Thr 在纯水中修饰冰晶形貌效果。

图 15: GDL-L-Ser (式 (7) 的化合物) 抑制冰晶生长活性的显微镜光学图片冰晶尺寸大小的统计图。

图 16: GDL-L-Val (式 (8) 的化合物) 抑制冰晶生长活性的显微镜光学图片冰晶尺寸大小的统计图。

图 17: 实施例 3 制备的 TR 短肽抑制冰晶生长活性的光学显微图片和冰晶尺寸大小的统计图。

图 18: 实施例 3 制备的 TR 短肽在纯水中修饰冰晶形貌效果。

图 19: 实施例 8 类肽 R-COOH, R-CH₃ 以及 R-CH₂CH₃ 抑制冰晶生长活性效果。

图 20: 实施例 8 类肽(A)R-COOH, (B)R-CH₃ 以及(C)R-CH₂CH₃ 在纯水中修饰冰晶形貌效果。

图 21: 冰吸附实验及其装置示意图;

图 22: 实施例 9 两种 PVA 的冰吸附量随浓度变化图;

图 23: 两种 PVA 在 DPBS 溶液中冰晶生长的光学显微图片, A 为 a-PVA, B 为 i-PVA。

图 24: 新生 3 天的小鼠新鲜 (未冷冻) 卵巢器官切片染色图片;

图 25: 对比实例 8 冻存的卵巢器官解冻后切片染色图片;

图 26: 应用实例 13 冻存的卵巢器官解冻后切片染色图片;

图 27: 应用实例 14 冻存的卵巢器官解冻后切片染色图片;

图 28: 应用实例 15 冻存的卵巢器官解冻后切片染色图片;

图 29: 性成熟的小鼠新鲜 (未冷冻) 卵巢组织切片染色图片;

图 30: 对比实例 9 冻存的卵巢组织解冻后切片染色图片;

图 31: 应用实例 16 冻存的卵巢组织解冻后切片染色图片;

图 32: 应用实例 17 冻存的卵巢组织解冻后切片染色图片;

图 33: 应用实例 18 冻存的卵巢组织解冻后切片染色图片;

图 34: 应用实例 26 冻存的卵巢组织解冻后切片染色图片;

图 35: 应用实例 27 冻存的卵巢组织解冻后切片染色图片;

图 36: 应用实例 28 冻存的卵巢组织解冻后切片染色图片;

图 37: 应用实例 29 冻存的卵巢组织解冻后切片染色图片;

图 38: 应用实例 30 冻存的卵巢组织解冻后切片染色图片;

图 39: 应用实例 31 冻存的卵巢组织解冻后切片染色图片;

图40: 应用实例37冻存的卵巢组织解冻后切片染色图片;

图41: 应用实例38冻存的卵巢组织解冻后切片染色图片。

具体实施方式

下文将结合具体实施例对本发明的制备方法做更进一步的详细说明。应当理解, 下列实施例仅为示例性地说明和解释本发明, 而不应被解释为对本发明保护范围的限制。凡基于本发明上述内容所实现的技术均涵盖在本发明旨在保护的范围内。

下述实施例中所使用的实验方法如无特殊说明, 均为常规方法; 下述实施例中所用的试剂、材料等, 如无特殊说明, 均可从商业途径得到。

A. 控冰材料分子设计

本发明的控冰材料核心分子, 可以设计为各类与水有亲和性的基团以及与冰有亲和性的基团通过共价键或非共价键例如离子键连接而成。

本发明的控冰材料的分子设计方法, 包括如下步骤:

(1) 构建化合物分子结构库, 所述化合物分子含有亲水基团和亲冰基团;

(2) 采用分子动力学模拟 (Molecular dynamics simulation, MD), 模拟评估各化合物分子在冰水两相界面的铺展性能;

(3) 筛选出所需冰亲和性和水亲和性的控冰分子。

根据本发明, 所述控冰分子的主链为碳链或者肽链结构。

根据本发明, 所述步骤 (2) 的 MD 模拟可以通过 GROMACS、AMBER、CHARMM、NAMD、或 LAMMPS 进行。

根据本发明, 所述步骤 (2) MD 模拟中, 水分子模型可以选自 TIP3P、TIP4P、TIP4P/2005、SPC、TIP3P、TIP5P、或 SPC/E, 优选 TIP4P/2005 水分子模型。

根据本发明, 所述步骤 (2) MD 模拟中, 力场参数由 GROMOS、ESFF、MM 形态力场、AMBER、CHARMM、COMPASS、UFF、CVFF 等力场中的一种提供。

根据本发明, 所述步骤 (2) MD 模拟中, 模拟计算控冰分子之间的相互作用, 控冰分子与水分子的相互作用, 控冰分子与冰-水分子的相互作用。所述作用包括是否形成氢键、范德华尔斯作用、静电作用、疏水作用、 π - π 作用等。

根据本发明, 所述步骤 (2) MD 模拟中, 所述模拟计算分子相互作用时, 对温度和压强进行调节。在本发明的一个实施方式中, 采用 V-rescale (modified Berendsen) 温度控制器和压强控制器调节温度和压强。

根据本发明, 所述步骤 (2) MD 模拟中, 通过选择势能参数以保持化合物分子的分子构型。优选, 所选择的势能参数使化合物分子的分子构型在较高温度下得以保持。

根据本发明, 所述步骤 (2) 中, 模拟水溶液体系时, x, y, z 三个方向均采用周期性边界条件; 模拟冰水混合体系时, x, y 两个方向采用周期性边界条件。

根据本发明, 所述步骤 (2) MD 模拟中, 选用立方体或八面体水盒子, 优选 $3.9 \times 3.6 \times 1.0 \text{ nm}^3$ 的立方体水盒子。

作为本发明的具体实施方案, 所述 MD 模拟在分子动力学计算过程中, V-rescale (modified Berendsen) 温度控制器和压强控制器调节温度和压强。

在所述 MD 模拟计算中, 判断氢键存在的主要准则为能量准则或几何准则, 优选几何准则; 当氧原子间距小于 0.35 nm, 角 $\text{HO} \cdots \text{H}$ 小于 30 度时, 两个羟基或者羟基与水分子间形成氢键。

作为本发明的具体实施方式, 所述控冰材料可以为碳链结构作为主链并被亲冰基团和亲水基团取代的化合物; 所述控冰材料可以含有亲水和亲冰双重亲和性的基团, 例如羟基、氨基, 还可以分别含有亲冰基团和亲水基团。例如, 所述控冰材料分子结构设计为具有 $-\text{[CH}_2\text{-CHOH]-}$ 的重复单元。

在本发明的实施方案中, 所述控冰材料分子为聚乙烯醇 (PVA)。PVA 选自等规 PVA、间规 PVA 和无规 PVA 的一种或两种以上的组合, 例如所述 PVA 的间同规整度为 15 %-65 %, 具体地例如 40 %-60 %、53 %-55 %。优选无规 PVA, 例如所述 PVA 的间同规整度为 45 %-65 % 的 PVA。所述 PVA 可选自分子量为 10-500 kDa 或者更高分子量的 PVA, 例如分子量为 10-30 kDa、30-50 kDa、80-90 kDa、200-500 kDa。所述 PVA 可选自水解度大于 80 % 的 PVA, 例如水解度为 80 %-99 %、82 %-87 %、87 %-89 %、89 %-99 %、98 %-99 %。

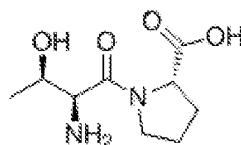
在本发明的实施方案中,所述控冰材料分子为肽类化合物。所述肽类化合物由亲冰性氨基酸,如:苏氨酸(L-Thr)、谷氨酰胺(L-Gln)、天冬氨酸(L-Asn)等与其他亲水性氨基酸或葡萄糖内酯(GDL)或糖类反应得到,所述其他亲水性氨基酸可选自精氨酸、脯氨酸、丙氨酸等。

所述肽类化合物为两个以上的氨基酸单元形成的肽类,如:2-8个氨基酸单元,具体地可以为2-5个,例如2个、3个、4个、5个、6个氨基酸单元;每个氨基酸单元不同。所述肽类化合物中亲冰氨基酸如苏氨酸与其他亲水氨基酸的摩尔比为(0.1-3):1,优选(0.5-2):1。所述肽类化合物中亲冰氨基酸与其他亲水氨基酸的排列方式没有特别的限定,可采用本领域已知的氨基酸连接基团或化学键连接,例如亲冰氨基酸和亲水氨基酸可以单个间次排列,也可以多个亲冰氨基酸或者多个亲水氨基酸相连,形成亲冰氨基酸片段或亲水氨基酸片段,再分别与亲水氨基酸(或片段)、亲冰氨基酸(或片段)连接。

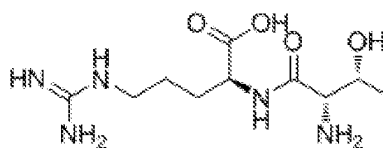
在本发明的实施方案中,所述肽类化合物为L-Thr-L-Arg(TR),L-Thr-L-Pro(TP),L-Arg-L-Thr(RT),L-Pro-L-Thr(PT),L-Thr-L-Arg-L-Thr(TRT),L-Thr-L-Pro-L-Thr(TPT),L-Ala-L-Ala-L-Thr(AAT),L-Thr-L-Cys-L-Thr(TCT)中的至少一种。

在另一实施方案中,所述肽类化合物为GDL-L-氨基酸,例如GDL-L-Thr、GDL-L-Ser、GDL-L-Val。

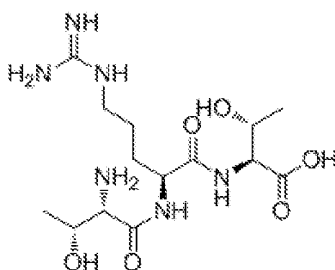
在又一实施方案中,所述肽类化合物具有式(1)-式(8)所示任一结构:



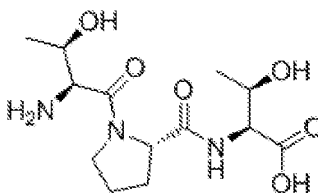
式(1)



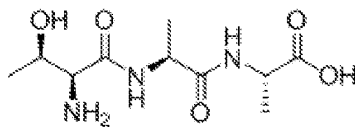
式(2)



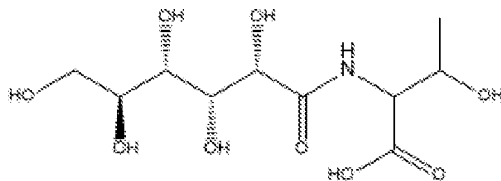
式(3)



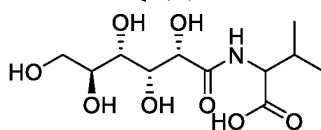
式(4)



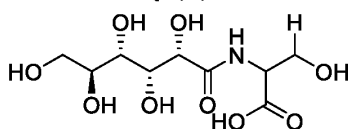
式 (5)



式 (6)



式 (7)



式 (8)。

上述肽类化合物的制备方法,可以采用本领域已知的多肽合成方法合成,例如采用固相合成法合成。

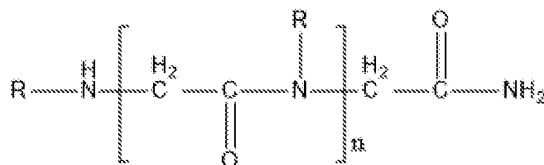
根据本发明的制备方法,包括如下步骤:树脂溶胀、一种氨基保护的氨基酸共价连接在溶胀的树脂上、脱保护、加入另一种氨基保护的氨基酸缩合反应、脱保护、切割、纯化。

可以用本发明已知的氨基酸与糖类反应的方法制备糖肽衍生物,例如可以将葡萄糖内酯或其他糖类与氨基酸在有机溶剂中反应制备所述糖肽衍生物,或者采用固相合成方法制备所述糖肽衍生物,将葡萄糖内酯(GDL)溶解在有机溶剂中,并将氨基酸和碱性催化剂加入到有机溶剂里,完全溶解后加入到葡萄糖内酯的溶液中,55-60°C反应,反应结束后,过滤掉白色沉淀物,把滤液蒸干得到粗产物。

根据本发明的制备方法,所述有机溶剂可以选自甲醇、乙醇等。

在一个实施方案中,采用固相合成法制备糖肽衍生物,包括:树脂溶胀、将一种氨基保护的氨基酸共价键连接在溶胀的树脂上、脱保护、加入糖类化合物(例如开环后的葡萄糖内酯)缩合反应、切割、纯化。GDL-L-Val和GDL-L-Ser的合成方法参照GDL-L-Thr的合成方法。

本发明还提供式(9)所示的肽类化合物:

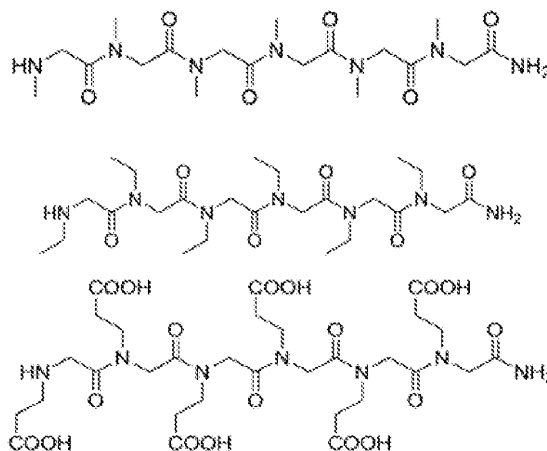


式 (9),

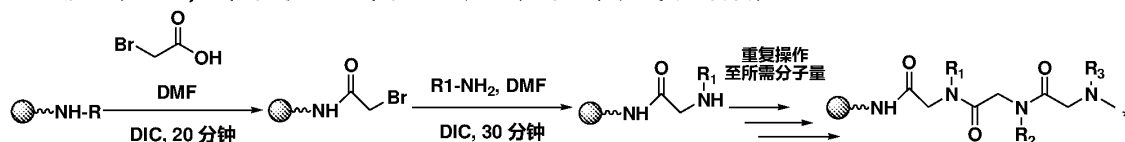
其中, R选自取代或未取代的烷基,所述取代基可以选自-OH、-NH₂、-COOH、-CONH₂等,例如, R为取代或未取代的C1-6烷基,优选R为-CH₃、-CH₂CH₃、-CH₂CH₂COOH; n为大于等于1而小于等于1000的整数,例如可以为1~100范围内的整数。在本发明的一些实施方式中, n为2、3、4、5、

6、7、8、9、10的整数。

作为本发明的一个实施方案，所述式(9)所示化合物具有如下任一所示的结构：



根据本发明，所述式(9)所示的化合物采用如下合成路线制备：



在本发明的实施方案中，所述控冰材料分子为氨基酸或聚氨基酸。本发明还提供上述控冰材料分子，例如PVA、肽类化合物、氨基酸和聚氨基酸用于控制水溶液中冰晶生长的应用、上述肽类化合物用于制备细胞或组织冷冻保存液的应用。

根据本发明所设计并制备的控冰材料例如PVA、肽类化合物、氨基酸和聚氨基酸用于制备冷冻保存液，用于细胞、组织、器官等的冷冻保存。

【实施例1】

(1) 化合物分子结构设计：

设计含有具有 $[-CH_2-CHOH-]$ 的重复单元的化合物分子，得到包括无规和等规的聚乙烯醇分子模型的结构库。

(2) MD模拟实验

通过MD模拟实验预测无规聚乙烯醇和等规聚乙烯醇对于冰和水的亲和性差异。

a. MD模拟均由GROMACS 5.1完成，水模型选用TIP4P/2005，其熔点约为252.5K。PVA分子的相互作用参数由GROMOS54A7力场提供，采用leapfrog积分算法，积分步长为2fs。静电相互作用通过PME方法计算，库伦作用势和L-J作用势的截断半径均为1.0nm。由V-rescale(modified Berendsen)温度控制器和压强控制器调节温度和压强。时间常数设为0.1ps。

b. 模拟选取含有7个重复单元的化合物分子链进行研究。PVA分子的拓扑文件通过ATB生成，且为了保持两种PVA分子的立构规整度，需对分子碳链的二面角势函数做相应的调整。

c. 模拟PVA的水溶液体系时，x, y, z三个方向均采用周期性边界条件；模拟冰水混合体系时，x, y两个方向采用周期性边界条件。所有体系均模拟120 ns，取后60 ns的数据进行分析。

首先研究了分子的水溶液的体系，在只有一条PVA链的体系中，共有1491个水分子，压强为1atm，温度取240K、250K、260K、270K、300K、330K。

在研究PVA分子与冰的相互作用的体系中，在 $3.9 \times 3.6 \times 1.0 \text{ nm}^3$ 的水盒子中放入6条PVA分子链，把含有1100个水分子的冰块在240K下平衡10ns，把冰块沿z轴方向放置在水盒子下方。把混合体系z方向的大小增大到10nm，并把冰水混合体系置于水盒子中央。

PVA分子的拓扑文件通过ATB生成，直接使用该拓扑文件，且为了保持两种PVA分子的立构

规整度，选择势能参数为 50kcal/mol，能够保证即使在较高的温度下，两种 PVA 分子的分子构型也能被保持住。

MD 模拟的两种 PVA 的分子结构模型参见图 9。

(3) 评估模拟结果

a-PVA 因三倍相邻 OH 的距离与冰的晶格尺寸匹配，故可以有效地与冰表面发生氢键作用而吸附在冰面上。i-PVA 因只改变羟基方向而不改变相邻 OH 的距离，故可保证 i-PVA 与 a-PVA 具有相似的与冰发生吸附作用的能力。同时，根据 MD 模拟结果可知，a-PVA 与水分子形成的分子间氢键数多于 i-PVA 与水分子形成的分子间氢键数，故 a-PVA 与水的亲和性较 i-PVA 更强。此外，MD 模拟 6 条 PVA 分子链在冰水界面的状态显示，a-PVA 因与冰和水都具有良好的亲和性而更倾向于在冰水界面铺展；而 i-PVA 因与水的亲和性较弱，在冰水界面倾向聚集（图 2）。

表 1

T / K	a-PVA		i-PVA	
	分子内氢键	分子间氢键	分子内氢键	分子间氢键
240	0.72(0.12)	6.76(0.43)	1.67(0.20)	5.92(0.42)
250	0.73(0.13)	6.87(0.32)	1.63(0.20)	5.95(0.36)
260	0.74(0.14)	6.83(0.35)	1.59(0.16)	6.04(0.35)
270	0.70(0.11)	6.87(0.30)	1.54(0.18)	6.13(0.34)
300	0.70(0.12)	6.74(0.35)	1.50(0.19)	6.09(0.28)
330	0.70(0.14)	6.54(0.33)	1.45(0.18)	6.05(0.31)

MD 模拟显示，240 K 时冰水界面处两种 PVA 与水分子的可接触面积，a -PVA 的可接触表面积大于 i-PVA，进一步验证了 a-PVA 在冰水界面的铺展性能优于 i-PVA（参见图 10）。MD 计算的两种 PVA 在水溶液中的聚集概率，i-PVA 明显高于 a-PVA（图 11）；而且 240K 时，在冰水界面处，两种 PVA 与冰-水分子形成的氢键数目相当，但 a- PVA 在冰水界面处以及水溶液中与水形成分子间氢键数要明显多于 i-PVA；故 a-PVA 可在冰水界面更好的铺展，而 i-PVA 则聚集（图 12）。

因此，通过 MD 模拟的多项结果均显示，a-PVA 由于其分子结构与水分子具有更好的亲和性，因此在冰水界面有更好的铺展性能，相比于 i-PVA，应当具有更好的控冰效果。

(4) 合成所设计的 PVA 分子

(4.1)制备无规立构聚乙烯醇 a-PVA:分子量约为 13~23kDa, 间同规整度 r(diad syndiotacticity) 约为 55%

氩气氛围保护下，在 250 mL 圆底烧瓶中将已除去抑制剂的乙酸乙烯酯（vinyl acetate, VAc, Sigma-Aldrich）溶解在 100 mL 的溶剂中（甲醇）以获得 25 %~45 %的 VAc 溶液。将上述溶液冷却到-5 °C后，将 80 mM 的 2,2'-偶氮二(2-甲基丙腈)（2,2'-Azobis(2-methylpropionitrile, Sigma-Aldrich) 小心滴加到反应溶液中。将上述溶液放置室温后继续搅拌 15 小时后，将反应溶液用 1 L 的丙酮溶解并滴加到甲醇中获得白色沉淀。上述沉淀用甲醇清洗过滤后，在 60°C烘箱真空干燥 6.0 小时获得白色固体。将白色固体溶解到甲醇溶液中（10 wt. %），并通氩气以除去溶液中的氧气，并将 25%的氢氧化钾的甲醇溶液滴加到上述溶液中，持续搅拌 4 小时后，将反应溶液溶解在 2M 的盐酸溶液中，并在 2.0 M 的氨的甲醇溶液中沉淀以获得无规立构聚乙烯醇（a-PVA）。氢核磁共振谱（图 3）显示所得化合物为水解完全 a-PVA。

(4.2) 制备全同立构聚乙烯醇 i-PVA: 分子量约为 14~26 kDa, 全同规整度 m (isotacticity) 约为 84%

a. 聚叔丁基乙烯基醚的制备（poly-tert-butyl vinyl ether, PBVE）。氩气氛围保护下，在 250 mL 圆底烧瓶中将叔丁基乙烯基醚（tert-butyl vinyl ether, t-BVE, Sigma-Aldrich）溶解在 100 mL 的干燥甲苯中获得 2.5 %的 t-BVE 的甲苯溶液。将上述溶液冷却到-78 °C后，将 0.2 mM 的三氟化硼乙醚（BF₃·OEt₂, Sigma-Aldrich) 小心滴加到已冷却的溶液中，并于 2.0 小时后补加 0.2 mM 的 BF₃·OEt₂。将上述溶液在-78 °C继续搅拌 3.0 小时后，用少量甲醇终止反应。并将反应溶液滴加到快速搅拌的 2.0 L 的甲醇中获得淡黄色沉淀。上述沉淀用甲醇清洗过滤后，在 60 °C烘箱真空干燥 6.0 小时获得淡黄色固体粉末，氢核磁共振谱（图 4A）显示所得化合物为 PBVE。通过调控三氟化硼乙醚与叔丁基

乙烯基醚的浓度来控制所合成的 PBVE 的分子量。凝胶渗透色谱 (GPC 采用四氢呋喃 (THF) 体系测得, 流速为 1 mL min^{-1}) 显示成功合成获得具有不同分子量的 PBVE (图 5)。

b. 干燥溴化氢气体的制备 (HBr); 在一个 100 mL 的两口烧瓶中, 将 5.0~30 mL 的三溴化磷 (PBr_3 , 阿拉丁) 逐滴加入到 10 mL 48% 的溴化氢 (HBr, Alfa Aesar) 水溶液中。所生成的气体依次通过四氯化碳 (CCl_4), 红磷 (P, Alfa Aesar) 以及氯化钙 (CaCl_2) 以得到干燥的 HBr 气体。

c. 全同立构聚乙烯醇 (isotactic-PVA, i-PVA) 的制备。在氩气氛围保护下, 将 0.5 g 的 PBVE 溶解到 15 mL 干燥甲苯溶液中, 并持续通入干燥氩气以除去溶液中的氧气。在 0°C 下, 将 b 步骤中制备的干燥 HBr 气体通入到上述无氧的 PBVE 的甲苯溶液中。约 5.0 分钟后, 淡黄色沉淀生成, 持续通入干燥的 HBr 气体直到没有沉淀继续生成。将上述反应溶液倒入 2.0 M 的 200 mL 的氯的甲醇溶液中。所得沉淀用甲醇清洗过滤后, 在 60°C 烘箱真空干燥 6.0 小时以获得淡黄色固体粉末。氢核磁共振谱 (图 4B) 显示 PBVE 水解完全得固体 i-PVA。

(5) 所合成的 PVA 控冰效果验证

(5.1) 动态光散射 DLS 实验

两种 PVA (a-PVA: 分子量约为 13~23 kDa, 间同规整度 r (diad syndiotacticity) 约为 55% (Sigma-Aldrich); i-PVA: 分子量约为 14~26 kDa, 全同规整度 m (isotacticity) 约为 84%) 在 25°C 水溶液中的粒径分布采用动态光散射 (DLS) 实验测量, 实验仪器为带有恒温腔室和 4 mW He-Ne 激光 ($\lambda=632.8\text{nm}$) 的 Nano ZS (Malvern Instruments), 其中散射角为 173° 。首先, 分别配制浓度为 1.0mg mL^{-1} 、 4.0mg mL^{-1} 、 10mg mL^{-1} 、 20mg mL^{-1} 的 a-PVA 和 i-PVA 水溶液; 将约 1.0 mL 的 PVA 溶液装入 12 mm 的一次性用聚苯乙烯比色皿进行测量。

动态光散射 (DLS) 结果显示, 相同浓度的 a-PVA 在水溶液中的分散尺寸远小于 i-PVA (图 6)。即, 相比于 a-PVA, i-PVA 在水溶液中更倾向于以聚集状态存在。这与 MD 模拟中 a-PVA 的分子内氢键数少于 i-PVA 的分子内氢键数, a-PVA 与水分子的分子间氢键数多于 i-PVA 与水分子的分子间氢键数的结果一致。

(5.2) 冰晶重结晶抑制 (IRI) 活性测量

冰晶重结晶抑制 (IRI) 活性采用“喷射冷冻法”, 将样品溶解分散到 DPBS 溶液中, 将 10~30 μL 上述溶液在 1.0 m 以上的高度滴加到 -60°C 预冷的干净硅片表面, 利用冷热台以 $10^\circ\text{C min}^{-1}$ 的速度缓慢升温到 -6°C , 并在该温度下退火 30 min, 利用偏光显微镜以及高速摄像机观察记录冰晶的大小, 冷热台密封, 保证内部的湿度在 50% 左右。每一个样品重复至少三次, 使用 Nano Measurer 1.2 统计冰晶的尺寸, 统计结果的误差为标准偏差。

(5.3) 冰晶形貌 (DIS) 观察和热滞后 (TH) 测量

冰晶形貌 (DIS) 观察和热滞后 (Thermal Hysteresis, TH) 测量采用纳升渗透压仪, 首先用酒精灯外焰融化毛细管, 并同时拉伸产生极细孔径毛细管, 将毛细管与微量进样器相连。将黏度较高的浸镜油注入微米孔径圆片中, 利用微量进样器将溶解了材料的水溶液注入微孔中。通过控制温度, 使液滴快速结冰, 并缓慢升温以获得单晶冰, 以 0.01°C 的精度缓慢降温, 利用配备了高速摄像机的显微镜观察冰晶形貌以及 TH 测试。

a-PVA (M_w 13~23 kD) 抑制冰晶生长的能力远远优于相应分子量的 i-PVA (M_w 14~26 kD) (图 7)。图 7A 中可见, a-PVA 冰晶尺寸明显小于同浓度时 i-PVA 的冰晶尺寸; 图 7B 中可见, a-PVA 相对于 DPBS 的最大冰晶尺寸 (MLGS) 在 2.0 mg mL^{-1} 后达到最小, 最小约为 DPBS 最大冰晶尺寸的 20%; 不同分子量的 i-PVA 相对于 DPBS 的 MLGS 随着浓度的增加有所增加, 并在 10 mg mL^{-1} 达到最小, 最小仅约为 DPBS 最大冰晶尺寸的 50%, 且随着浓度继续增加到 20 mg mL^{-1} , MLGS 不再减少且有略微增加。聚合度大于 333 的 i-PVA (M_w 14~26 kD) 在浓度大于 30 mg mL^{-1} 时溶解困难, 故因 i-PVA 溶解度的限制, i-PVA 的 IRI 活性最优为 10 mg mL^{-1} 时 50% 的 DPBS 的 MLGS; 而 a-PVA 的 IRI 活性最优为 2.0 mg mL^{-1} 时 20% 的 DPBS 的 MLGS。这与 MD 模拟中, a-PVA 比 i-PVA 更容易在冰水界面处铺展的结果一致, 所述更容易铺展的性能, 使 a-PVA 在比 i-PVA 更低的用量情况下就能实现更好的抑制冰晶生长的效果。

从以上 MD 模拟以及实际验证实验结果可见, 两者的结果一致性好, MD 模拟可以准确预测控冰

材料的控冰性能,可有效实现控冰材料分子设计。

采用同样的分子设计方法设计了式(1)-式(9)的化合物,并合成,研究其控冰效果。

【实施例2】式(1)化合物的合成

(1) 将2-氯三苯甲基氯树脂(2-Chlorotrityl Chloride Resin)放入反应管中,加DCM(20 mL g⁻¹),振荡30分钟。砂芯抽滤除去溶剂,加入三倍摩尔过量Fmoc-L-Pro-OH,再加入8倍摩尔过量的DIEA,最后加入DMF溶解,振荡30分钟。甲醇封头30分钟。

(2) 除去溶剂DMF,加20%哌啶/DMF溶液(10 mL g⁻¹),5分钟后除去溶剂,再加入20%哌啶/DMF溶液(10 mL g⁻¹),15分钟后除去哌啶溶液。取少量树脂,用乙醇清洗三次后,加入茚三酮试剂,105~110°C加热5分钟,变深蓝色为阳性反应。

(3) 将上述反应得到产物用依次用DMF(15 mL g⁻¹,两次)、甲醇(15 mL g⁻¹,两次)以及DMF(15 mL g⁻¹,两次)清洗后,向反应管中加入用尽量少的DMF溶解的Fmoc-L-Thr(tBu)-OH;两倍过量,HBTU两倍过量。之后,立刻加入8倍过量的DIEA,反应30分钟。

(4) 抽掉溶液后,取少量树脂,用乙醇清洗三次后,加入茚三酮试剂,105~110°C加热5分钟,无色为阴性反应,即反应完全。

(5) 将上述反应得到产物用依次用DMF(15 mL g⁻¹,两次)、甲醇(15 mL g⁻¹,两次)以及DMF(15 mL g⁻¹,两次)清洗后除去溶剂,加20%哌啶/DMF溶液(10 mL g⁻¹),5分钟后除去溶剂,再加入20%哌啶/DMF溶液(10 mL g⁻¹),15分钟后除去哌啶溶液,取少量树脂,用乙醇清洗后,加入茚三酮试剂,105~110°C加热5分钟,变深蓝色为阳性反应。

(6) 将上述反应得到产物用依次用DMF(15 mL g⁻¹,两次)、甲醇(15 mL g⁻¹,两次)以及DCM(15 mL g⁻¹,两次)清洗后抽干树脂。

(7) 使用切割液(15 mL g⁻¹,TFA:水:EDT:Tis=95:1:2:2,V/V)将产物切割90分钟。并将切割液用氮气吹干,之后冻干,得到多肽粗品。

(8) 用HPLC纯化多肽并转盐或脱盐,HPLC:tR=6.1 mins(纯化柱子型号:Kromasil 100-5C18,4.6mm*250mm;梯度洗脱液:0.1%TFA 乙腈溶液和0.1%TFA 水溶液,0 mins-1:99,20 mins-1:9)。将纯化后的溶液冻干,既得到成品L-Thr-L-Pro(记为TP)。产率约为80%。质谱鉴定217.3为[M+H]⁺。

【实施例3】式(2)化合物的合成

(1) 将2-氯三苯甲基氯树脂放入反应管中,加DCM(20 mL g⁻¹),振荡30分钟。砂芯抽滤除去溶剂,加入三倍摩尔过量Fmoc-L-Thr(tBu)-OH,再加入8倍摩尔过量的DIEA,最后加入DMF溶解,振荡30分钟。甲醇封头30分钟。

(2) 除去溶剂DMF,加20%哌啶/DMF溶液(10 mL g⁻¹),5分钟后除去溶剂,再加入20%哌啶/DMF溶液(10 mL g⁻¹),15分钟后除去哌啶溶液。取少量树脂,用乙醇清洗三次后,加入茚三酮试剂,105~110°C加热5分钟,变深蓝色为阳性反应。

(3) 将上述反应得到产物用依次用DMF(15 mL g⁻¹,两次)、甲醇(15 mL g⁻¹,两次)以及DMF(15 mL g⁻¹,两次)清洗后,向反应管中加入用尽量少的DMF溶解的Fmoc-Arg(Pbf)-OH;两倍过量,HBTU两倍过量。之后,立刻加入8倍过量的DIEA,反应30分钟。

(4) 抽掉溶液后,取少量树脂,用乙醇清洗三次后,加入茚三酮试剂,105~110°C加热5分钟,无色为阴性反应,即反应完全。

(5) 将上述反应得到产物用依次用DMF(15 mL g⁻¹,两次)、甲醇(15 mL g⁻¹,两次)以及DMF(15 mL g⁻¹,两次)清洗后除去溶剂,加20%哌啶/DMF溶液(10 mL g⁻¹),5分钟后除去溶剂,再加入20%哌啶/DMF溶液(10 mL g⁻¹),15分钟后除去哌啶溶液,取少量树脂,用乙醇清洗后,加入茚三酮试剂,105~110°C加热5分钟,变深蓝色为阳性反应。

(6) 将上述反应得到产物用依次用DMF(15 mL g⁻¹,两次)、甲醇(15 mL g⁻¹,两次)以及DCM(15 mL g⁻¹,两次)清洗后抽干树脂。

(7) 使用切割液(15 mL g⁻¹,TFA:水:EDT:Tis=95:1:2:2,V/V)将产物切割90分钟。并将切割液用氮气吹干,之后冻干,得到多肽粗品。

(8) 用HPLC纯化多肽并转盐或脱盐,HPLC:tR=4.8 mins(纯化柱子型号:Kromasil 100-5C18,4.6mm*250mm;梯度洗脱液:0.1%TFA 乙腈溶液和0.1%TFA 水溶液,0 mins-1:99,20 mins-1:4)。将纯化后的溶液冻干,既得到成品L-Thr-L-Arg(TR)。产率约为80%。质谱鉴定276.2

为[M+H]⁺。

【实施例4】式(3)化合物的合成

(1) 将2-氯三苯甲基氯树脂放入反应管中,加DCM(20 mL g⁻¹),振荡30分钟。砂芯抽滤除去溶剂,加入三倍摩尔过量Fmoc-L-Thr(tBu)-OH,再加入8倍摩尔过量的DIEA,最后加入DMF溶解,振荡30分钟。甲醇封头30分钟。

(2) 除去溶剂DMF,加20%吡啶/DMF溶液(10 mL g⁻¹),5分钟后除去溶剂,再加入20%吡啶/DMF溶液(10 mL g⁻¹),15分钟后除去吡啶溶液。取少量树脂,用乙醇清洗三次后,加入茚三酮试剂,105~110°C加热5分钟,变深蓝色为阳性反应。

(3) 将上述反应得到产物用依次用DMF(15 mL g⁻¹,两次)、甲醇(15 mL g⁻¹,两次)以及DMF(15 mL g⁻¹,两次)清洗后,向反应管中加入用尽量少的DMF溶解的Fmoc-Arg(Pbf)-OH;两倍过量,HBTU两倍过量。之后,立刻加入8倍过量的DIEA,反应30分钟。

(4) 抽掉溶液后,取少量树脂,用乙醇清洗三次后,加入茚三酮试剂,105~110°C加热5分钟,无色为阴性反应,即反应完全。

(5) 将上述反应得到产物用依次用DMF(15 mL g⁻¹,两次)、甲醇(15 mL g⁻¹,两次)以及DMF(15 mL g⁻¹,两次)清洗后除去溶剂,加20%吡啶/DMF溶液(10 mL g⁻¹),5分钟后除去溶剂,再加入20%吡啶/DMF溶液(10 mL g⁻¹),15分钟后除去吡啶溶液,取少量树脂,用乙醇清洗后,加入茚三酮试剂,105~110°C加热5分钟,变深蓝色为阳性反应。

(6) 将上述反应得到产物用依次用DMF(15 mL g⁻¹,两次)、甲醇(15 mL g⁻¹,两次)以及DMF(15 mL g⁻¹,两次)清洗后抽干树脂。

(7) 重复操作(3)~(5),链接氨基酸Fmoc-L-Thr(tBu)-OH。反应得到产物用依次用DMF(15 mL g⁻¹,两次)、甲醇(15 mL g⁻¹,两次)以及DCM(15 mL g⁻¹,两次)清洗后抽干树脂。

(8) 使用切割液(15 mL g⁻¹,TFA:水:EDT:Tis=95:1:2:2,V/V)将产物切割90分钟。并将切割液用氮气吹干,之后冻干,得到多肽粗品。

(9) 用HPLC纯化多肽并转盐或脱盐,HPLC:tR=3.9 mins(纯化柱子型号:Kromasil 100-5C18,4.6mm*250mm;梯度洗脱液:0.1%TFA 乙腈溶液和0.1%TFA 水溶液,0 mins-1:99,20 mins-1:4)。将纯化后的溶液冻干,既得到成品L-Thr-L-Arg-L-Thr (TRT)。产率约为75%。质谱鉴定377.4为[M+H]⁺。

【实施例5】式(4)化合物的合成

(1) 将2-氯三苯甲基氯树脂放入反应管中,加DCM(20 mL g⁻¹),振荡30分钟。砂芯抽滤除去溶剂,加入三倍摩尔过量Fmoc-L-Thr(tBu)-OH,再加入8倍摩尔过量的DIEA,最后加入DMF溶解,振荡30分钟。甲醇封头30分钟。

(2) 除去溶剂DMF,加20%吡啶/DMF溶液(10 mL g⁻¹),5分钟后除去溶剂,再加入20%吡啶/DMF溶液(10 mL g⁻¹),15分钟后除去吡啶溶液。取少量树脂,用乙醇清洗三次后,加入茚三酮试剂,105~110°C加热5分钟,变深蓝色为阳性反应。

(3) 将上述反应得到产物用依次用DMF(15 mL g⁻¹,两次)、甲醇(15 mL g⁻¹,两次)以及DMF(15 mL g⁻¹,两次)清洗后,向反应管中加入用尽量少的DMF溶解的Fmoc-L-Pro-OH;两倍过量,HBTU两倍过量。之后,立刻加入8倍过量的DIEA,反应30分钟。

(4) 抽掉溶液后,取少量树脂,用乙醇清洗三次后,加入茚三酮试剂,105~110°C加热5分钟,无色为阴性反应,即反应完全。

(5) 将上述反应得到产物用依次用DMF(15 mL g⁻¹,两次)、甲醇(15 mL g⁻¹,两次)以及DMF(15 mL g⁻¹,两次)清洗后除去溶剂,加20%吡啶/DMF溶液(10 mL g⁻¹),5分钟后除去溶剂,再加入20%吡啶/DMF溶液(10 mL g⁻¹),15分钟后除去吡啶溶液,取少量树脂,用乙醇清洗后,加入茚三酮试剂,105~110°C加热5分钟,变深蓝色为阳性反应。

(6) 将上述反应得到产物用依次用DMF(15 mL g⁻¹,两次)、甲醇(15 mL g⁻¹,两次)以及DMF(15 mL g⁻¹,两次)清洗后抽干树脂。

(7) 重复操作(3)~(5),链接氨基酸Fmoc-L-Thr(tBu)-OH。反应得到产物用依次用DMF(15 mL g⁻¹,两次)、甲醇(15 mL g⁻¹,两次)以及DCM(15 mL g⁻¹,两次)清洗后抽干树脂。

(8) 使用切割液(15 mL g⁻¹,TFA:水:EDT:Tis=95:1:2:2,V/V)将产物切割90分钟。并将切割液用氮气吹干,之后冻干,得到多肽粗品。

(9) 用 HPLC 纯化多肽并转盐或脱盐, HPLC: $t_R = 7.6$ mins (纯化柱子型号: Kromasil 100-5C18, 4.6mm*250mm; 梯度洗脱液: 0.1%TFA 乙腈溶液 和 0.1%TFA 水溶液, 0 mins-1:99, 20 mins-2:8)。将纯化后的溶液冻干, 既得到成品 L-Thr-L-Pro-L-Thr (TPT)。产率约为 70 %。质谱鉴定 318.3 为 $[M+H]^+$

【实施例 6】 式 (5) 化合物的合成

(1) 将 2-氯三苯甲基氯树脂放入反应管中, 加 DCM(20 mL g^{-1}), 振荡 30 分钟。砂芯抽滤除去溶剂, 加入三倍摩尔过量 Fmoc-L-Thr(tBu)-OH, 再加入 8 倍摩尔过量的 DIEA, 最后加入 DMF 溶解, 振荡 30 分钟。甲醇封头 30 分钟。

(2) 除去溶剂 DMF, 加 20% 哌啶/DMF 溶液(10 mL g^{-1}), 5 分钟后除去溶剂, 再加入 20% 哌啶/DMF 溶液(10 mL g^{-1}), 15 分钟后除去哌啶溶液。取少量树脂, 用乙醇清洗三次后, 加入茚三酮试剂, 105~110°C 加热 5 分钟, 变深蓝色为阳性反应。

(3) 将上述反应得到产物用依次用 DMF (15 mL g^{-1} , 两次)、甲醇 (15 mL g^{-1} , 两次) 以及 DMF (15 mL g^{-1} , 两次) 清洗后, 向反应管中加入用尽量少的 DMF 溶解的 Fmoc-L-Ala-OH; 两倍过量, HBTU 两倍过量。之后, 立刻加入 8 倍过量的 DIEA, 反应 30 分钟。

(4) 抽掉溶液后, 取少量树脂, 用乙醇清洗三次后, 加入茚三酮试剂, 105~110°C 加热 5 分钟, 无色为阴性反应, 即反应完全。

(5) 将上述反应得到产物用依次用 DMF (15 mL g^{-1} , 两次)、甲醇 (15 mL g^{-1} , 两次) 以及 DMF (15 mL g^{-1} , 两次) 清洗后除去溶剂, 加 20% 哌啶/DMF 溶液(10 mL g^{-1}), 5 分钟后除去溶剂, 再加入 20% 哌啶/DMF 溶液(10 mL g^{-1}), 15 分钟后除去哌啶溶液, 取少量树脂, 用乙醇清洗后, 加入茚三酮试剂, 105~110°C 加热 5 分钟, 变深蓝色为阳性反应。

(6) 将上述反应得到产物用依次用 DMF (15 mL g^{-1} , 两次)、甲醇 (15 mL g^{-1} , 两次) 以及 DMF (15 mL g^{-1} , 两次) 清洗后抽干树脂。

(7) 重复操作 (3) ~ (5), 链接氨基酸 Fmoc-L-Ala-OH。反应得到产物用依次用 DMF (15 mL g^{-1} , 两次)、甲醇 (15 mL g^{-1} , 两次) 以及 DCM (15 mL g^{-1} , 两次) 清洗后抽干树脂。

(8) 使用切割液 (15 mL g^{-1} , TFA: 水: EDT: Tis= 95:1:2:2, V/V) 将产物切割 90 分钟。并将切割液用氮气吹干, 之后冻干, 得到多肽粗品。

(9) 用 HPLC 纯化多肽并转盐或脱盐, HPLC: $t_R = 7.9$ mins (纯化柱子型号: Kromasil 100-5C18, 4.6mm*250mm; 梯度洗脱液: 0.1%TFA 乙腈溶液溶液乙腈溶液 和 0.1%TFA 水溶液水溶液, 0 mins-1:99, 20 mins-1:9)。将纯化后的溶液冻干, 既得到成品 L-Ala-L-Ala-L-Thr (AAT)。产率约为 70 %。质谱鉴定 260.1 为 $[M-8H]^+$ 。

【实施例 7】 式 (6)、式 (7) 和式 (8) 化合物的合成

制备式 (6) 所示的化合物:

(1) 通过固相合成的方法制备 GDL- L-Thr。

(2) HPLC 纯化, HPLC: $t_R = 3.4$ mins (纯化柱子型号: SHIMADZU Intertsil ODS-SP(4.6mm*250mm*5 μ m); 梯度洗脱液: 0.1%TFA 乙腈溶液 和 0.1%TFA 水溶液, 0.01-20 mins-1:99, 20-30 mins-21:79, 30-40 mins-100:0, 40-50 mins-1:99), 产率约为 50 %, 质谱鉴定 296.099 为 $[M-H]^+$ 。

固相合成方法制备的 GDL- L-Thr 纯度更高, 更利于产物分离, 实验结果表明, 固相合成制备的 GDL- L-Thr 纯度更高, 且保持良好的抑制冰晶生长能力 (图 13)。

分子式 (7)、(8) 所示的化合物皆可用固相合成方法得到。

【实施例 8】 式 (9) 化合物的合成

(1) 将 Dichlorodimethylsilane 的 DCM 溶液倒入多肽合成管中, 静至 30 分钟后将合成管晾干备用。

(2) 取用 100mg 树脂于合成管中, 加入 2mL 的 DMF, 通氮气, 溶胀树脂 10 分钟后抽滤。

(3) 加入 1mL 的 4-甲基哌啶/DMF 溶液去保护, 5 分钟后除去, 再加 1mL 的 4-甲基哌啶/DMF 溶液, 15 分钟后除去, 鼓泡, 抽滤。

(4) DMF 冲洗 5 次, 鼓泡, 抽滤。

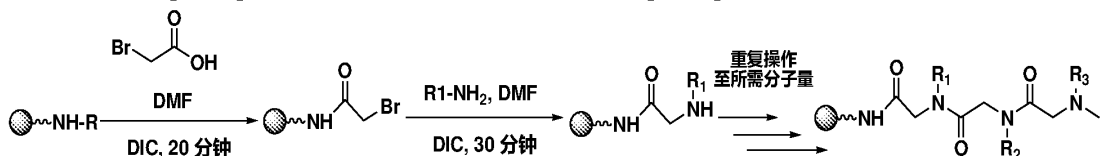
(5) 依次加入 2M, 0.5mL 的溴乙酸/DMF 溶液, N,N-二异丙基碳二亚胺/DMF 溶液, 鼓泡 20 分钟, 抽滤, DMF 冲洗 3 次。

(6) 加入 1M, 1mL 的伯胺/DMF 溶液, 鼓泡 30 分钟, DMF 冲洗, 二氯甲烷冲洗 (x3)。

(7) 重复步骤 5, 6, 直至所需的分子量。

(8) 加入 4mL 的裂解液, 充分摇匀, 通氮气吹干, 最后冷冻干燥, 纯化处理, 得到最终成品。

R 为 $-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2\text{CH}_3$ 以及 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$ 的类肽。质谱鉴定 444.6 是 R 为 $-\text{CH}_3$ 的 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 528.8 是 R 为 $-\text{CH}_2\text{CH}_3$ 的 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 792.1 是 R 为 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$ 的 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。



【冰晶重结晶抑制实验】

冰晶重结晶抑制 (IRI) 活性采用“喷射冷冻法”, 将样品溶解分散到 DPBS 溶液中, 将 10~30 μL 上述溶液在 1.0m 以上的高度滴加到 -60°C 预冷的干净硅片表面, 利用冷热台以 $10^\circ\text{C}/\text{min}$ 的速度缓慢升温到 -6°C , 并在该温度下退火 30min, 利用偏光显微镜以及高速摄像机观察记录冰晶的大小, 冷热台密封, 保证内部的湿度在 50% 左右。每一个样品重复至少三次, 使用 Nano Measurer 1.2 统计冰晶的尺寸, 统计结果的误差为标准偏差。

冰晶形貌 (DIS) 观察和热滞后 (Thermal Hysteresis, TH) 测量采用纳升渗透压仪, 首先用酒精灯外焰熔化毛细管, 并同时拉伸产生极细孔径毛细管, 将毛细管与微量进样器相连。将黏度较高的浸镜油注入微米孔径圆片中, 利用微量进样器将溶解了材料的水溶液注入微孔中。通过控制温度, 使液滴快速结冰, 并缓慢升温以获得单晶冰, 以 0.01°C 的精度缓慢降温, 利用配备了高速摄像机的显微镜观察冰晶形貌以及 TH 测试。

对上述实施例 3 中制备的 TR 的 DPBS 溶液 20 μL 利用“喷射冷冻法”进行 IRI 活性测试。测得的相对于 DPBS 的最大冰晶尺寸 (%) 如图 17 所示。通过化学键结合的 TR 的最大冰晶尺寸明显小于相同浓度下精氨酸的 DPBS 溶液和苏氨酸的 DPBS 溶液的最大冰晶尺寸。

取上述实施例 3 中制备的 TR 的去离子水溶液, 利用纳升进行冰晶形貌观察发现, TR 有微弱的修饰冰晶形貌的效果 (过冷度 -0.1°C , $-0.4\sim-0.01^\circ\text{C}$), 如图 18 所示。且并未测得热滞后。

对上述实施例 7 中制备的 GDL-L-Thr、GDL-L-Ser 和 GDL-L-Val 的 DPBS 溶液 20 μL 利用“喷射冷冻法”进行 IRI 活性测试。测得的相对于 DPBS 的最大冰晶尺寸 (%) 如图 13、15-16 所示。通过化学键结合的 GDL-L-Thr、GDL-L-Ser 和 GDL-L-Val 的最大冰晶尺寸明显小于相同浓度下 GDL 的 DPBS 溶液和氨基酸的 DPBS 溶液的最大冰晶尺寸, 且小于同浓度 GDL 和氨基酸混合的 DPBS 溶液的最大冰晶尺寸。

取上述实施例 7 中制备的 GDL-L-Thr 的去离子水溶液, 利用纳升进行冰晶形貌观察发现, GDL-L-Thr 有微弱的修饰冰晶形貌的效果 (过冷度 -0.1°C , $-0.4\sim-0.01^\circ\text{C}$), 如图 14 所示。且并未测得热滞后。

对上述实施例 8 中制备的化合物的 DPBS 溶液 20 μL 利用“喷射冷冻法”进行 IRI 活性测试。测得的相对于 DPBS 的最大冰晶尺寸 (%) 如图 19 所示。

取上述实施例 8 中制备的三类肽的去离子水溶液, 利用纳升进行冰晶形貌观察发现 R 为 $-\text{CH}_3$ 以及 $-\text{CH}_2\text{CH}_3$ 的类肽有较为明显的修饰冰晶形貌的效果, R 为 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$ 的类肽无修饰冰晶形貌的效果 (过冷度 -0.1°C , $-0.4\sim-0.01^\circ\text{C}$) 所得形貌如图 20 所示, 且三类类肽皆并未测得热滞后。

上述结果表明, 所制备的肽类化合物具有抑制冰晶生长的活性, 修饰冰晶形貌的效果, 其中 R 为 $-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2\text{CH}_3$ 的式 (9) 化合物修饰冰晶形貌的效果优异, 且没有热滞后, 能实现控制冰晶生长的作用, 可以用于冷冻保存液。

B. 控冰材料控冰性能评估与筛选

控冰材料在冰表面的吸附量 = (冰表面所吸附的控冰材料质量 m_1 / 含有控冰材料的原溶液中控冰材

料的总质量 m_2) $\times 100\%$ 。

在一个实施方案中,所述冰吸附实验包括以下步骤:

S1: 取质量为 m_2 的控冰材料,配制所述控冰材料的水溶液,降温至过冷温度;

S2: 将预冷的控温棒置于所述水溶液中诱导冰层在控温棒表面生长,持续搅拌水溶液,以待控冰材料逐渐吸附于冰层表面,保持水溶液、控温棒温度在过冷温度;

S3: 测定控冰材料在冰表面的吸附量。

采用图 21 所示的装置进行冰吸附实验,包括多层储液腔、控温棒和温度控制器,所述多层储液腔由里到外依次包括冰吸附腔、温浴腔、冷却液储存腔,所述控温棒置于冰吸附腔内,所述控温棒和储液腔的温度由温度控制器控制。所述控温棒为导热材料制成的中空结构,所述控温棒的中空结构设置有进液口和排液口;所述温度控制器为流体温控器,所述温度控制器设置有冷却液流出端和回流端;所述冷却液储存腔两端设置有进液口和排液口;所述温度控制器的冷却液流出端、控温棒的进液口、控温棒的排液口、冷却液储存腔的进液口、冷却液储存腔的排液口以及温度控制器的回流端依次经管道连通,所述管道内流动冷却液。多层储液腔设有盖子。使用时,所述冰吸附腔内盛放控冰材料的水溶液,中层温浴腔装有预定温度的温浴介质例如水浴、冰浴或者油浴等;冷却液温度达到设定温度后,经温度控制器流出,流入中空的控温棒中空结构,对控温棒温度实现控制,随后从控温棒排液口流出,再流入外层冷却液储存腔保持温浴介质的温度在预定水平,再经冷却液储存腔的排液口流经温度控制器的回流端进入温度控制器循环。

【实施例 9】

a-PVA: 分子量约为 13~23kDa, 间同规整度 r (diad syndiotacticity) 约为 55% (Sigma-Aldrich);

i-PVA: 分子量约为 14~26kDa, 全同规整度 m (isotacticity) 约为 84%。

(1) 测定两种 PVA 在冰水界面的铺展性能

采用冰吸附实验测定 PVA 在冰表面的吸附量,实验装置如图 21 所示。

a. 将 a-PVA 和 i-PVA 用 FITC Isomer I 荧光标记。

b. 将 FITC 标记的不同浓度 PVA 水溶液 (40mL) 置于烧杯中,将烧杯置于循环冷槽中并将溶液温度以及控温棒冷却到 -0.1°C 。

c. 将控温棒插入到事先冷却的 FITC 标记的 PVA 水溶液之前,先将控温棒插入液氮中预冷 1.0 分钟。之后,再快速的将控温棒插入已经预冷的 FITC 标记的 PVA 水溶液里,以便在控温棒表面诱导一层极薄的冰层以诱导冰的生长。

d. FITC 标记的 PVA 水溶液在过冷温度 -0.1°C 下持续磁力搅拌 1.0 小时,以待 PVA 逐渐吸附到冰的表面。所有吸附实验保持过冷度以及吸附时间不变以此确保所得冰的表面积在误差允许范围内几乎不变。

e. 将形成的冰块从溶液中取出,并用纯水淋洗表面以除去附着在表面的溶液。将冰块融化。

f. PVA 在冰表面的吸附量由冰块中溶质 PVA 的质量比原始溶液中溶质 PVA 的质量获得,PVA 溶液的浓度由紫外可见分光光度法确定,体积由移液枪以及量筒确定。

冰吸附实验显示各浓度的 a-PVA 和 i-PVA 吸附量如图 22 所示,a-PVA 在冰表面的吸附量由 0.2 mg mL^{-1} 浓度时的 16.3% 增加到 1.0 mg mL^{-1} 的 28.7%,并且在浓度大于 1.0 mg mL^{-1} 后,a-PVA 在冰表面的吸附量达到饱和,饱和时吸附量约为 36.5%。i-PVA 在浓度小于 1.0 mg mL^{-1} 时冰吸附量为 0%~19.3%,低于同浓度下 a-PVA 在冰表面的吸附量。在低浓度时,两种 PVA 对冰的吸附皆未达到饱和,i-PVA 覆盖的冰表面积低于 a-PVA。

当 i-PVA 浓度 $\geq 1.2\text{ mg mL}^{-1}$ 吸附在冰面上的量高于 a-PVA,并在 2.0 mg mL^{-1} 时 i-PVA 在冰面上的吸附量达到饱和,饱和时的吸附量为 56.5%。进一步说明,两种 PVA 对相同大小的冰表面吸附覆盖达到饱和时,所需 i-PVA 的量远大于 a-PVA。也就是说 a-PVA 可以更有效的覆盖冰的表面。

(2) 冰晶重结晶抑制 (IRI) 活性测量

冰晶重结晶抑制 (IRI) 活性采用“喷射冷冻法”,将上述两种 PVA 分别溶解分散到 DPBS 溶液中,将 $10\sim 30\mu\text{L}$ 所述溶液在 1.0m 以上的高度滴加到 -60°C 预冷的干净硅片表面,利用冷热台以 $10^\circ\text{C min}^{-1}$ 的速度缓慢升温到 -6°C ,并在该温度下退火 30 min,利用偏光显微镜以及高速摄像机观察记录

冰晶的大小，冷热台密封，保证内部的湿度在 50% 左右。每一个样品重复至少三次，使用 Nano Measurer 1.2 统计冰晶的尺寸，结果的误差为标准偏差。

结果如图 23 所示，a-PVA 冰晶尺寸明显小于同浓度时 i-PVA 的冰晶尺寸，说明 a-PVA 抑制冰晶生长的能力远远优于 i-PVA。

根据实施例 9 的结果可以看出，i-PVA 与水的亲和性较 a-PVA 弱。因此，i-PVA 在水溶液以及冰水界面倾向于以聚集状态存在，而 a-PVA 在水溶液以及冰水界面可以很好的铺展。两种 PVA 对相同大小的冰表面吸附覆盖达到饱和时，所需 i-PVA 的量远高于 a-PVA。因此，a-PVA 与 i-PVA 相比，是更好的控冰材料，较低浓度即能起到更好的抑制冰晶生长的效果。

C. 冷冻保存液配方和制备、应用实例

【实施例 10】制备含 PVA 为控冰材料的冷冻保存液

1. 制备冷冻保存液：按以下配方配制冷冻保存液

冷冻保存液 A：每 100mL 中含有如下组分：

物质	含量
PVA (g)	2.0
乙二醇 (mL)	10
DMSO (mL)	10
蔗糖 (mol L ⁻¹)	0.5
胎牛血清 (mL)	20
DPBS (mL)	余量

配液步骤：将 2.0 g 的 PVA 在 80°C 水浴中加热并磁力搅拌溶于 25mL 的 DPBS 中，待 PVA 全部溶解并冷却到室温后调节 pH 为 7.0，为溶液 1；17g (0.05mol) 的蔗糖（蔗糖在冷冻保存液中终浓度为 0.5mol L⁻¹）超声溶解于 25mL 的 DPBS 中，待蔗糖全部溶解后加入 10mL 的乙二醇、10mL 的 DMSO，为溶液 2，待溶液 1 及溶液 2 恢复至室温，再将两种溶液混均，调节 pH 值并定容补齐余量至总体积的 80%，20mL 血清单独存放待保存液使用时添加。

冷冻保存液 B：每 100ml 中含有如下组分：

物质	含量
L-Arg (g)	8.0
L-Thr (g)	4.0
PVA (g)	2.0
乙二醇 (mL)	10
蔗糖 (mol L ⁻¹)	0.5
胎牛血清 (mL)	20
DPBS (mL)	余量

配液步骤：将 2.0 g 的 PVA 在 80°C 水浴中加热并磁力搅拌溶于 20mL 的 DPBS 中，调节 pH 为 7.1，为溶液 1；将 8.0 g 的 L-Arg 和 4.0 g 的 L-Thr 溶于 20mL 的 DPBS 中，调节 pH 为 7.1，为溶液 2；17g (0.05mol) 的蔗糖（蔗糖在冷冻保存液中终浓度为 0.5mol L⁻¹）超声溶解于 20mL 的 DPBS 中，待蔗糖全部溶解后加入 10mL 的乙二醇，为溶液 3；待溶液 1、溶液 2 及溶液 3 恢复至室温，再将三种溶液混均，调节 pH 值并定容补齐余量至总体积的 80%，使用时加入 20mL 的血清。

冷冻保存液 C：每 100ml 中含有以下组分：

物质	用量
PVA (g)	2.0
乙二醇 (mL)	10
蔗糖 (mol L ⁻¹)	0.5
胎牛血清 (mL)	20

DPBS (mL)	余量
-----------	----

配液步骤：将 2.0 g 的 PVA 在 80°C 水浴中加热并磁力搅拌溶于 25mL 的 DPBS 中，调节 pH 为 6.9，为溶液 1；17g (0.05mol) 的蔗糖（蔗糖在冷冻保存液中终浓度为 0.5mol L⁻¹）超声溶解于 25mL 的 DPBS 中，待蔗糖全部溶解后加入 10mL 的乙二醇，为溶液 2，待溶液 1 及溶液 2 恢复至室温，再将两种溶液混均，调节 pH 值并定容补齐余量至总体积的 80%，20mL 血清单独存放待保存液使用时添加。

冷冻保存液 C1：每 100ml 中含有以下组分：

物质	用量
PVA (g)	1.0
乙二醇 (mL)	10
蔗糖 (mol L ⁻¹)	0.5
血清 (mL)	20
DPBS (ml)	余量

配液步骤同冷冻保存液 C。

冷冻保存液 D：每 100ml 中含有以下组分：

物质	用量
PVA (g)	2.0
乙二醇 (mL)	10
蔗糖 (mol L ⁻¹)	0.5
DPBS (mL)	余量

配液步骤：将 2.0 g 的 PVA 在 80°C 水浴中加热并磁力搅拌溶于 30mL 的 DPBS 中，调节 pH 为 7.0，为溶液 1；17g (0.05mol) 的蔗糖（蔗糖在冷冻保存液中终浓度为 0.5mol L⁻¹）超声溶解于 25mL 的 DPBS 中，待蔗糖全部溶解后加入 10mL 的乙二醇，为溶液 2，待溶液 1 及溶液 2 恢复至室温，再将两种溶液混均，调节 pH 值并定容补齐余量至总体积 100 mL，备用。

冷冻保存液 E：每 100ml 中含有以下组分：

物质	用量
聚-L-脯氨酸 (g)	1.5
PVA (g)	2.0
乙二醇 (ml)	10
蔗糖 (mol L ⁻¹)	0.5
DPBS (ml)	余量

配液步骤：将 2.0 g 的 PVA 在 80°C 水浴中加热并磁力搅拌溶于 25mL 的 DPBS 中，调节 pH 为 7.0，为溶液 1；将 1.5g 的聚-L-脯氨酸（聚合度 15）超声溶于另外 20mL 的 DPBS 中，调节 pH 为 7.0，为溶液 2；17g (0.05mol) 的蔗糖（蔗糖在冷冻保存液中终浓度为 0.5mol L⁻¹）超声溶于 25mL 的 DPBS 中，待蔗糖全部溶解后依次加入 10mL 乙二醇，为溶液 3，待溶液 1、溶液 2 及溶液 3 恢复至室温，再将 3 种溶液混均，调节 pH 值并定容补齐余量至总体积 100 mL，备用。

冷冻保存液 F：每 100ml 中含有以下组分：

物质	用量
聚-L-精氨酸 (g, 聚合度为 8)	4.0
PVA (g)	1.0
乙二醇 (ml)	10
蔗糖 (mol L ⁻¹)	0.5
血清 (ml)	20
DPBS (ml)	余量

配液步骤同冷冻保存液 E，血清在使用时加入。

2. 制备冷冻平衡液：按以下配方配制冷冻平衡液

冷冻平衡液 a：将 7.5mL 的乙二醇、7.5mL 的 DMSO 加入 65mL 的 DPBS 中，混匀，使用时加入 20 mL 的血清。

冷冻平衡液 b：将 7.5mL 的乙二醇溶于 72.5 mL 的 DPBS 中，混匀，使用时加 20mL 的血清。

冷冻平衡液 c：将 2.0g 的 PVA 在 80°C 水浴中加热并磁力搅拌溶于 50mL 的 DPBS 中，待 PVA 全部溶解，调节 pH 为 7.0，加入 7.5mL 乙二醇，混匀，调节 pH 值并定容补齐余量至 100mL，备用。

对比例：

冷冻平衡液 a：每 1 mL 中含有 7.5% (v/v) 的 DMSO, 7.5% (v/v) 的乙二醇，20% (v/v) 的胎牛血清，余量为 DPBS；

冷冻保存液 1#：每 1 mL 中含有 15% (v/v) 的 DMSO, 15% (v/v) 的乙二醇，20% (v/v) 的胎牛血清，0.5M 蔗糖，余量为 DPBS。

冷冻平衡液 2#：每 1 mL 中含有 7.5% (v/v) 的乙二醇，20% (v/v) 的胎牛血清，余量为 DPBS；

冷冻保存液 2#：每 1 mL 中含有 10% (v/v) 的乙二醇，20% (v/v) 的胎牛血清，0.5M 蔗糖，余量为 DPBS。

冷冻保存液 3#：每 1 mL 中含有 10% (v/v) 的 DMSO, 15% (v/v) 的胎牛血清，余量为培养基 a-MEM (USA, Invitrogen, C12571500BT)

实施例 10 和对比例采用的解冻液配方有如下三种：

解冻液 1#：解冻液 I (含有 1.0 mol L⁻¹ 蔗糖，20% 的血清，余量为 DPBS)；解冻液 II (含有 0.5 mol L⁻¹ 蔗糖，20% 的血清，余量为 DPBS)；解冻液 III (含有 0.25 mol L⁻¹ 蔗糖，20% 的血清，余量为 DPBS)；解冻液 IV (20% 的血清，余量为 DPBS)。

解冻液 2#：解冻液 I (含有 1.0mol L⁻¹ 的蔗糖，20 mg mL⁻¹ 的 PVA，余量为 DPBS)；解冻液 II (含有 0.5 mol L⁻¹ 蔗糖，20 mg mL⁻¹ 的 PVA，余量为 DPBS)；解冻液 III (含有 0.25 mol L⁻¹ 蔗糖，20 mg mL⁻¹ 的 PVA，余量为 DPBS)；解冻液 IV (20 mg mL⁻¹ 的 PVA，余量为 DPBS)。

解冻液 3#：解冻液 I (含有 1.0mol L⁻¹ 的蔗糖，20 mg mL⁻¹ 的 PVA，10 mg mL⁻¹ 的聚脯氨酸，余量为 DPBS)；解冻液 II (含有 0.5 mol L⁻¹ 蔗糖，20 mg mL⁻¹ 的 PVA，5.0 mg mL⁻¹ 的聚脯氨酸，余量为 DPBS)；解冻液 III (含有 0.25 mol L⁻¹ 蔗糖，20 mg mL⁻¹ 的 PVA，2.5 mg mL⁻¹ 的聚脯氨酸，余量为 DPBS)；解冻液 IV (20 mg mL⁻¹ 的 PVA，余量为 DPBS)。

【应用例 1】卵母细胞和胚胎冷冻保存采用上述实施例及对比例的冷冻平衡液以及冷冻保存液按表 1 和表 2 中的方案分别进行卵母细胞和胚胎冷冻保存。本发明实施例中存活率均为 3-12 次重复实验的存活率平均值。

1. 卵母细胞冷冻保存

小鼠卵母细胞先置于冷冻平衡液中平衡 5 分钟；然后置于所制备冷冻保存液中 1 分钟，将已在冷冻保存液中平衡后的卵母细胞放置于冷冻载杆上，然后快速投入液氮中 (-196 °C) 中，并封闭载杆后继续保存；解冻时，将冻存的卵母细胞置于 37°C 的解冻液 I 中平衡 5 分钟，再依次在解冻液 II-IV 中各平衡 3 分钟；将解冻完毕的卵母细胞培养 2 小时后观察存活细胞数量，计算存活率 (参见表 1)。

2. 胚胎冷冻保存

小鼠胚胎先置于冷冻平衡液平衡 5 分钟，然后置于上述实施例或对比例中的配方所制备冷冻保存液 50 秒，将已在冷冻保存液中平衡的胚胎放置于冷冻载杆上，然后快速投入液氮 (-196 °C) 中，并封闭载杆后继续保存；解冻时，将胚胎置于 37°C 的解冻液 I 中平衡 3 分钟，再依次在解冻液 II-IV 中各平衡 3 分钟；将解冻完毕胚胎培养 2 小时，观察存活胚胎数量，计算存活率 (参见表 2)。

表 1 小鼠卵母细胞冷冻保存存活率

编号	平衡液	冷冻保存液	解冻液	冻卵总数	2 小时后存活率
应用实例 1	a	A	解冻液 1#	67	100.0%
应用实例 2	b	B	解冻液 1#	109	94.8%
应用实例 3	b	C	解冻液 1#	90	97.7%

应用实例 4	c	D	解冻液 1#	50	93.4%
应用实例 5	c	D	解冻液 2#	53	96.5%
应用实例 6	c	E	解冻液 1#	39	89.7%
应用实例 7	c	E	解冻液 3#	60	98.6%
对比实例 1	a	冷冻液 1#	解冻液 1#	146	95.0%
对比实例 2	平衡液 2#	冷冻液 2#	解冻液 1#	96	81.9%
对比实例 3	平衡液 2#	冷冻液 2#	解冻液 2#	44	94.7%

表 2 小鼠胚胎冷冻保存存活率

编号	平衡液	冷冻保存液	解冻液	冻胚胎总数	2 小时后存活率
应用实例 8	c	D	解冻液 1#	41	95.8%
应用实例 9	c	E	解冻液 1#	42	95.2%
对比实例 4	a	冷冻液 1#	解冻液 1#	38	94.3%
对比实例 5	平衡液 2#	冷冻液 2#	解冻液 1#	39	82.4%

以上数据表明该冷冻保存液可以达到 90% 以上甚至 100% 的存活率, 能达到或远远超过目前临床普遍使用的含有 15% DMSO 的商业化冷冻保存液的冷冻保存复苏率, 应用实例 1 (含有 10% 的 DMSO) 和对比实例 2 (含有 7.5% 的 DMSO) 以及对比实例 1, 即商业化的卵母细胞冻存液 (含有 15% 的 DMSO) 的对比可以看出, PVA 的加入显著提高了卵母细胞的存活率; 应用实例 2-3 也表明, 本发明少加 DMSO 或者不含有 DMSO 的冷冻保存液, 也能达到较高的卵母细胞或胚胎存活率解决了目前临床普遍使用的商业化冷冻保存液 DMSO 浓度高, 对细胞损害大的问题; 并且, 应用实例 5、7-9 表明, 在冷冻液, 平衡液以及解冻液中均不添加 DMSO 和血清的情况下, 也可实现较高的卵母细胞或胚胎存活率。既无 DMSO 也无血清的冷冻保存液, 解决了目前临床普遍使用的商业化冷冻保存液因含有血清而造成的保质期短、可带入寄生性生物污染物质等问题。

【应用例 2】人脐带充间质干细胞冷冻保存

采用上述实施例及对比例的冷冻保存液按表 3 中的方案分别进行人脐带充间质干细胞的冷冻保存。

微滴法冷冻保存人脐带充间质干细胞: 将培养皿上的人脐带间充质干细胞用 25% 胰酶消化 2 分钟后, 放入等体积培养液 (10% FBS+a-MEM 培养基), 轻柔吹打至干细胞全部脱落, 加入 1.5 mL 离心管, 1000rpm 离心 5 分钟, 弃上清 (将细胞与培养基分离), 将 10uL 冷冻液加入离心管底部, 轻柔吹打使干细胞团分散, 将此 10uL 带有干细胞的冷冻液置于冷冻载片上, 置于液氮 (-196°C) 冻存。解冻时, 将带有细胞及冷冻液的冷冻载杆直接放入 37°C 培养基中进行解冻。解冻后, 台盼蓝染色察看其存活率, 并使用仪器 JIMBIO-FIL 计数细胞数量, 存活率 = 活细胞数/细胞总数 (参见表 3)。

表 3 人脐带充间质干细胞冷冻保存存活率

编号	冷冻保存液	冷冻保存方法	存活率
应用实例 10	C1	微滴法	72.2%
应用实例 11	D	微滴法	77.1%
应用实例 12	F	微滴法	92.4%
对比实例 6	冷冻液 1#	微滴法	63.9%
对比实例 7	冷冻液 3#	微滴法	76.6%

本发明的冷冻保存液进行人脐带充间质干细胞冷冻保存时, 即使不使用 DMSO 干细胞存活率可达 92.4% 和 72.2% (应用实例 12 和 10), 甚至在完全不添加 DMSO 和血清时, 存活率可达到 77.1%, 达到现有冷冻试剂的存活率水平, 表明该冷冻用试剂不仅能达到常规冷冻液冷冻干细胞的有效性, 达到或甚至远高于目前普遍使用的含有 10% 的 DMSO 的冷冻保存液 (对比实例 7) 的冷冻保存复苏率, 基于 PVA 的冷冻保存效果显著优于不添加 PVA 的对比实例 6。

【应用例 3】卵巢器官与卵巢组织冻存

采用上述实施例及对比例的冷冻平衡液以及冷冻保存液按表 4、表 5 中的方案分别对新生 3 天内的小鼠卵巢器官和性成熟小鼠的卵巢组织切片进行冷冻保存。

整个卵巢器官或者卵巢组织切片先置于平衡液室温平衡 25 分钟，然后置于所制备的冷冻保存液中 15 分钟，之后将完整卵巢器官或卵巢组织切片放置于冷冻载杆上，投入液氮中保存。解冻后，完整卵巢器官或卵巢组织切片放入培养液(10%FBS+a-MEM)后置于 37℃、5%CO₂培养箱中复苏培养 2 小时后使用 4%多聚甲醛固定、石蜡包埋、HE 染色观察形态，结果如图 24-33 所示，图 24 为新鲜未冷冻的卵巢器官切片照片，图 29 为新鲜未冷冻的卵巢组织切片照片。

表 4 卵巢器官冷冻保存方案

编号	平衡液	冷冻保存液	解冻液	形态
应用实例 13	c	D	解冻液 2#	图 26
应用实例 14	b	C1	解冻液 1#	图 27
应用实例 15	b	F	解冻液 1#	图 28
对比实例 8	a	冷冻液 1#	解冻液 1#	图 25

表 5 卵巢组织冷冻保存方案

编号	平衡液	冷冻保存液	解冻液	形态
应用实例 16	c	D	解冻液 2#	图 31
应用实例 17	b	C1	解冻液 1#	图 32
应用实例 18	b	F	解冻液 1#	图 33
对比实例 9	a	冷冻液 1#	解冻液 1#	图 30

根据图 24-图 28 可知，与使用不添加聚乙烯醇的对比实例 8 以及新鲜未冷冻的卵巢器官相比，应用实例 13-15 中原始卵泡结构相对完整，间质结构相对完整，细胞胞浆均质、淡染相对较多，胞核皱缩、深染相对较少；血管管壁结构完整，管腔塌陷较少，内皮细胞胞浆均质、淡染相对较多，胞核皱缩、深染相对较少。可见，应用实例 13-15 组对于卵巢器官的冻存效果更好。

根据图 29-图 33 可知，应用实例 16-18 的方案和对比实例 9 以及新鲜未冷冻的卵巢组织相比，窦卵泡结构相对完整，间质结构相对完整，细胞胞浆均质、淡染相对较多，胞核皱缩、深染相对较少，可见本发明的冻存液用于冻存卵巢组织也比现有技术具有更好的效果。

由此可见，本发明以 PVA 类仿生控冰材料为主要成分制备的冷冻保存液具有良好的抑制冰晶生长的效果，可以减少保存体系中 DMSO 的用量，甚至不加 DMSO，可保持良好的生物相容性，并且可以同时适用于卵母细胞、胚胎、干细胞、生殖器官和组织的冷冻保存，均可达到良好的细胞存活率和生物活性。

【实施例 11】制备氨基酸类控冰材料的冷冻保存液

冷冻保存液 G：每 100ml 中含有以下组分：

物质	含量
L-Arg (g)	16.0
L-Thr (g)	8.0
DMSO (mL)	10
乙二醇 (mL)	10
蔗糖 (mol L ⁻¹)	0.5
胎牛血清 (mL)	20
DPBS (mL)	余量

配液步骤：总体积 100 mL：将 16g 的 L-Arg 与 8g 的 L-Thr 溶于 25 mL 的 DPBS 中，调节 pH 为 6.9，为溶液 1；将 17g (0.05mol) 的蔗糖（蔗糖在冷冻保存液中终浓度为 0.5mol L⁻¹）超声溶解于 25mL 的 DPBS 中，待蔗糖全部溶解后依次加入 10mL 的乙二醇、10mL 的 DMSO，为溶液 2，待溶液 1 及溶液 2 恢复至室温，再将 2 种溶液混均，调节 pH 至 6.9，并用 DPBS 定容补齐余量至总体积的 80%，20mL 的胎牛血清单独存放，在冷冻保存液使用前加入。

冷冻保存液 H：每 100ml 中含有以下组分：

物质	含量
聚-L-脯氨酸 (g, 聚合度 15)	1.5
DMSO (mL)	10
乙二醇 (mL)	10
蔗糖 (mol L ⁻¹)	0.5
胎牛血清 (mL)	20
DPBS (mL)	余量

配液步骤: 将 1.5g 的聚-L-脯氨酸(聚合度为 15)超声溶解于 25 mL 的 DPBS 中, 调节 pH 为 6.8, 为溶液 1; 将 17g (0.05mol) 的蔗糖超声溶解于 25mL 的 DPBS 中, 待蔗糖全部溶解后依次加入 10 mL 的乙二醇、10 mL 的 DMSO, 为溶液 2, 待溶液 1 及溶液 2 恢复至室温, 再将两种溶液混均, 调节 pH 至 7.0, 并用 DPBS 定容补齐余量至总体积的 80%, 20 mL 的血清单独存放, 在冷冻保存液使用前加入。

冷冻保存液 I: 每 100ml 中含有以下组分:

物质	含量
聚-L-精氨酸 (g, 聚合度 8)	1.5
DMSO (mL)	10
乙二醇 (mL)	10
蔗糖 (mol L ⁻¹)	0.5
胎牛血清 (mL)	20
DPBS (mL)	余量

配液步骤: 总体积 100 mL, 将 1.5 g 的聚-L-精氨酸(聚合度为 8)超声溶解于 25 mL 的 DPBS 中, 调节 pH 为 7.0, 为溶液 1; 将 17g (0.05mol) 的蔗糖超声溶解于 20 mL 的 DPBS 中, 待蔗糖全部溶解后依次加入 10 mL 的乙二醇、10 mL 的 DMSO, 为溶液 2, 待溶液 1 及溶液 2 恢复至室温, 再将两种溶液混均, 调节 pH 至 7.0, 并用 DPBS 定容补齐余量至总体积的 80%, 20 mL 的血清单独存放, 在冷冻保存液使用前加入。

冷冻保存液 J: 每 100ml 中含有以下组分:

物质	含量
聚-L-精氨酸 (g, 聚合度 8)	4.0
DMSO (mL)	7.5
乙二醇 (mL)	10
蔗糖 (mol L ⁻¹)	0.5
胎牛血清 (mL)	20
DPBS (mL)	余量

配液步骤同冷冻保存液 I。

冷冻保存液 K: 每 100ml 中含有以下组分:

物质	含量
聚-L-脯氨酸 (g, 聚合度 8)	4.0
DMSO (mL)	7.5
乙二醇 (mL)	10
蔗糖 (mol L ⁻¹)	0.5
胎牛血清 (mL)	20
DPBS (mL)	余量

配液步骤同冷冻保存液 I。

冷冻保存液 L: 每 100ml 中含有以下组分:

物质	含量
L-Arg (g)	16.0
L-Thr (g)	8.0

DMSO (mL)	7.5
乙二醇 (mL)	10
蔗糖 (mol L ⁻¹)	0.5
胎牛血清 (mL)	20
DPBS (mL)	余量

配液步骤同冷冻保存液 G。

制备冷冻平衡液：按以下配方配制冷冻平衡液

冷冻平衡液 a：将 7.5mL 的乙二醇、7.5mL 的 DMSO 加入 65mL 的 DPBS 中，混匀，使用时加入 20 mL 的血清。

冷冻平衡液 b：7.5mL 的乙二醇加入 72.5mL 的 DPBS 中，混匀，使用时加入 20 mL 的血清。

对比例 2：

冷冻平衡液 a：每 1 mL 中含有 7.5% (v/v) 的 DMSO, 7.5% (v/v) 的乙二醇, 20% (v/v) 的胎牛血清, 余量为 DPBS；

冷冻保存液 1#：每 1 mL 中含有 15% (v/v) 的 DMSO, 15% (v/v) 的乙二醇, 20% (v/v) 的胎牛血清, 0.5M 蔗糖, 余量为 DPBS。

冷冻保存液 3#：每 1 mL 中含有 10% (v/v) 的 DMSO, 15% (v/v) 的胎牛血清, 余量为培养基 a-MEM (USA, Invitrogen, C12571500BT)

实施例 11 和对比例 2 采用的解冻液配方有如下一种：

解冻液 1#：解冻液 I (含有 1.0mol L⁻¹ 蔗糖, 20% 的血清, 余量为 DPBS)；解冻液 II (含有 0.5 mol L⁻¹ 蔗糖, 20% 的血清, 余量为 DPBS)；解冻液 III (含有 0.25 mol L⁻¹ 蔗糖, 20% 的血清, 余量为 DPBS)；解冻液 IV (20% 的血清, 余量为 DPBS)。

【应用例 4】卵母细胞和胚胎冷冻保存

采用上述实施例 11 及对比例 2 的冷冻平衡液以及冷冻保存液按表 6 和表 7 中的方案分别进行卵母细胞和胚胎冷冻保存。冷冻和解冻方法与应用例 1 相同。

表 6 小鼠卵母细胞冷冻保存存活率

编号	平衡液	冷冻保存液	解冻液	冻卵总数 (颗)	2 小时后存活率
应用实例 19	a	G	解冻液 1#	67	98.5%
应用实例 20	a	H	解冻液 1#	109	96.3%
应用实例 21	a	I	解冻液 1#	67	95.5%
对比实例 10	a	冷冻液 1#	解冻液 1#	146	95.0%

表 7 小鼠胚胎冷冻保存存活率

编号	平衡液	冷冻保存液	解冻液	冻胚胎总数 (颗)	2 小时后存活率
应用实例 22	a	J	解冻液 1#	25	100.00 %
对比实例 11	a	冷冻液 1#	解冻液 1#	38	94.30%

由表 6 和表 7 的数据可以看出，本发明的冷冻保存液在降低 DMSO 和 EG 用量的后进行卵母细胞和胚胎冷冻保存时，卵母细胞存活率可达 95% 以上，胚胎存活率可以达到存活率 100%，能达到甚至远高于目前临床普遍使用的含有 15% DMSO 的商业化冷冻保存液（对比实例 10-11）的冷冻保存复苏率，且添加了氨基酸仿生控冰材料的冷冻保存效果显著优于未添加仿生控冰材料的冷冻保存液。

【应用例 5】人脐带充间质干细胞的冷冻保存

采用上述实施例 11 及对比例 2 的冷冻保存液按表 8 中的方案分别进行人脐带充间质干细胞的冷冻保存。冷冻和解冻方法参见应用例 2。

表 8 人脐带充间质干细胞冷冻保存存活率

编号	冷冻保存液	冷冻保存方法	存活率
----	-------	--------	-----

应用实例 23	J	微滴法	81.2%
应用实例 24	K	微滴法	82.6%
应用实例 25	L	微滴法	80.5%
对比实例 12	冷冻液 1#	微滴法	63.9%
对比实例 13	冷冻液 3#	微滴法	76.6%

本发明的冷冻保存液进行人脐带间质干细胞冷冻保存时,即使不使用或仅使用少量 DMSO (7.5%) 干细胞存活率可达 80% 以上(例如应用实例 23-25),表明该冷冻用试剂不仅能达到常规冷冻液冷冻干细胞的有效性,甚至远高于目前普遍使用的含有 10% 的 DMSO 的冷冻保存液(对比实例 13) 的冷冻保存复苏率,添加了氨基酸仿生控冰材料的冷冻保存效果显著优于不添加氨基酸类控冰材料的对比实例 14、15。

【应用例 6】卵巢器官和卵巢组织的冷冻保存

采用上述实施例 11 及对比例 2 的冷冻平衡液以及冷冻保存液按表 9、表 10 中的方案分别对新生 3 天内的小鼠完整的卵巢器官和性成熟小鼠的卵巢组织切片进行冷冻保存。卵巢器官和性成熟小鼠的卵巢组织的冷冻和解冻方法参见应用例 3。

表 9 卵巢器官冷冻保存方案

编号	平衡液	冷冻保存液	解冻液	形态
应用实例 26	a	J	解冻液 1#	图 34
应用实例 27	a	L	解冻液 1#	图 35
应用实例 28	a	K	解冻液 1#	图 36
对比实例 14	a	冷冻液 1#	解冻液 1#	图 25

表 10 卵巢组织冷冻保存方案

编号	平衡液	冷冻保存液	解冻液	形态
应用实例 29	a	J	解冻液 1#	图 37
应用实例 30	a	L	解冻液 1#	图 38
应用实例 31	a	K	解冻液 1#	图 39
对比实例 15	a	冷冻液 1#	解冻液 1#	图 30

【实施例 11】制备肽类化合物控冰材料的冷冻保存液

冷冻保存液 M: 每 100ml 中含有以下组分:

物质	含量
TR (g)	28
DMSO (mL)	7.5
乙二醇 (mL)	10
蔗糖 (mol L ⁻¹)	0.5
胎牛血清 (mL)	20
DPBS (mL)	余量

配液步骤: 总体积 100mL, 将 28g TR 超声溶于 25mL DPBS 中, 调节 pH 为 7.0, 为溶液 1; 将 0.05mol 蔗糖超声溶解于 25mL DPBS 中, 待蔗糖全部溶解后依次加入 10mL 乙二醇、7.5mL DMSO, 为溶液 2, 待溶液 1 及溶液 2 恢复至室温, 再将两种溶液混匀, 调节 pH 并采用 DPBS 定容至总体积的 80%, 最后, 使用前加 20mL 血清。

冷冻保存液 N: 每 100ml 中含有以下组分:

物质	含量
TPT (g)	28
DMSO (mL)	7.5
乙二醇 (mL)	10

蔗糖 (mol L ⁻¹)	0.5
胎牛血清 (mL)	20
DPBS (mL)	余量

配液步骤: 总体积 100mL, 将 28gTPT 超声溶于 25mLDPBS 中, 调节 pH 为 7.0, 为溶液 1; 将 0.05mol 蔗糖超声溶解于 25mLDPBS 中, 待蔗糖全部溶解后依次加入 10mL 乙二醇、7.5mLDMSO, 为溶液 2, 待溶液 1 及溶液 2 恢复至室温, 再将两种溶液混匀, 调节 pH 并采用 DPBS 定容至总体积的 80%, 最后, 使用前加 20mL 血清。

冷冻保存液 O: 每 100ml 中含有以下组分:

物质	含量
TR (g)	28
乙二醇 (mL)	10
蔗糖 (mol L ⁻¹)	0.5
胎牛血清 (mL)	20
DPBS (mL)	余量

配液步骤: 体积 100mL, 将 28g TR 超声溶于 25mLDPBS 中, 调节 pH 为 7.0, 为溶液 1; 将 0.05mol 蔗糖超声溶解于 25mL DPBS 中, 待蔗糖全部溶解后依次加入 10mL 乙二醇, 为溶液 2, 待溶液 1 及溶液 2 恢复至室温, 再将两种溶液混匀, 调节 pH 并采用 DPBS 定容至总体积的 80%, 最后, 使用前加 20mL 血清。

制备冷冻平衡液: 按以下配方配制冷冻平衡液

冷冻平衡液 a: 将 7.5mL 的乙二醇、7.5mL 的 DMSO 加入 65mL 的 DPBS 中, 混匀, 使用时加入 20 mL 的血清。

对比例 3:

冷冻平衡液 a: 每 1 mL 中含有 7.5% (v/v) 的 DMSO, 7.5% (v/v) 的乙二醇, 20% (v/v) 的胎牛血清, 余量为 DPBS;

冷冻保存液 1#: 每 1 mL 中含有 15% (v/v) 的 DMSO, 15% (v/v) 的乙二醇, 20% (v/v) 的胎牛血清, 0.5M 蔗糖, 余量为 DPBS。

冷冻保存液 3#: 每 1 mL 中含有 10% (v/v) 的 DMSO, 15% (v/v) 的胎牛血清, 余量为培养基 a-MEM (USA, Invitrogen, C12571500BT)

实施例 12 和对比例 3 采用的解冻液配方有如下一种:

解冻液 1#: 解冻液 I (含有 1.0mol L⁻¹ 蔗糖, 20% 的血清, 余量为 DPBS); 解冻液 II (含有 0.5 mol L⁻¹ 蔗糖, 20% 的血清, 余量为 DPBS); 解冻液 III (含有 0.25 mol L⁻¹ 蔗糖, 20% 的血清, 余量为 DPBS); 解冻液 IV (20% 的血清, 余量为 DPBS)。

【应用例 7】卵母细胞和胚胎冷冻保存

采用上述实施例 13 及对比例 2 的冷冻平衡液以及冷冻保存液按表 11 和表 12 中的方案分别进行卵母细胞和胚胎冷冻保存。冷冻和解冻方法与应用例 1 相同。

表11 小鼠卵母细胞冷冻保存存活率

编号	平衡液	冷冻液	解冻液	冻卵总数	2小时后存活率
应用实例32	a	M	解冻液1#	93	96.2%
应用实例33	a	N	解冻液1#	48	90%
对比实例16	a	冷冻液1#	解冻液1#	146	95%

表12 小鼠胚胎冷冻保存存活率

编号	平衡液	冷冻液	解冻液	胚胎总数	2小时后存活率
----	-----	-----	-----	------	---------

应用实例34	a	M	解冻液1#	41	95.9%
对比实例17	a	冷冻液1#	解冻液1#	38	94.3%

表11和表12的数据表明,本发明多肽用于卵母细胞和胚胎冷冻保存,仅添加少量DMSO(7.5%)就能达到现有商业化冻存液(DMSO含量15%)的卵母细胞和胚胎存活率,并且应用实例32和应用实例34的数据表明,TR多肽用于卵母细胞和胚胎冻存具有更加优异的效果。

【应用例8】人脐带充间质干细胞的冷冻保存

采用上述实施例12及对比例3的冷冻保存液按表13中的方案分别进行人脐带充间质干细胞的冷冻保存。冷冻和解冻方法参见应用例2。

表13 人脐带充间质干细胞冷冻保存存活率

编号	冷冻保存液	冷冻保存方法	存活率
应用实例35	M	微滴法	87.8%
应用实例36	O	微滴法	75.1%
对比实例18	冷冻液3#	微滴法	76.6%

根据表13的结果可以看出,本发明的冷冻保存液不加入DMSO或仅加入少量DMSO(7.5%)时,就可以达到与现有技术中加入10%DMSO的冷冻保存液相当水平的细胞存活率,大大减少了DMSO的用量,减少了DMSO对于细胞的损伤和毒性,可以大大提高冷冻后干细胞的传代稳定性和细胞活性。

【应用例9】卵巢器官和卵巢组织的冷冻保存

采用上述实施例12及对比例3的冷冻平衡液以及冷冻保存液按表14、表15中的方案分别对新生3天内的小鼠完整的卵巢器官和性成熟小鼠的卵巢组织切片进行冷冻保存。卵巢器官和性成熟小鼠的卵巢组织的冷冻和解冻方法参见应用例3。

表14 卵巢器官冷冻保存方案

编号	平衡液	冷冻保存液	解冻液	形态
应用实例37	a	M	解冻液1#	图40
对比实例19	a	冷冻液1#	解冻液1#	图25

表15 卵巢组织冷冻保存方案

编号	平衡液	冷冻保存液	解冻液	形态
应用实例38	a	M	解冻液1#	图41
对比实例20	a	冷冻液1#	解冻液1#	图30

根据图24、25和图40可知,与使用不添加肽类仿生控冰材料的对比实例相比(图25、图30),采用应用实例37冷冻保存液冻存的卵巢器官解冻后的切片照片中显示卵泡结构相对完整,间质结构相对完整,细胞胞浆均质、淡染相对较多,胞核皱缩、深染相对较少;血管管壁结构完整,管腔塌陷较少,内皮细胞胞浆均质、淡染相对较多,胞核皱缩、深染相对较少。可见,应用实例37对于卵巢器官的冻存效果更好。

根据图29、图30和图41可知,应用实例38的方案和对比实例22新鲜未冷冻的成年小鼠卵巢组织相比,生长期卵泡及窦卵泡结构相对完整,可见本发明的冻存液用于冻存卵巢组织也比现有技术具有更好的效果。

由此可见,本发明以肽类仿生控冰材料为主要成分制备的冷冻保存液可以同时适用于卵母细胞、胚胎、干细胞、生殖器官和组织的冷冻保存,均可达到良好的细胞存活率和生物活性。

以上,对本发明的实施方式进行了说明。但是,本发明不限于上述实施方式。凡在本发明的精神和原则之内,所做的任何修改、等同替换、改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

权 利 要 求

1. 一种控冰材料的分子设计方法，其特征在于，包括如下步骤：
 - (1) 构建化合物分子结构库，所述化合物分子含有亲水基团和亲冰基团；
 - (2) 采用分子动力学模拟评估各化合物分子在冰水两相界面的铺展性能；
 - (3) 筛选出所需冰亲和性和水亲和性的化合物分子。
2. 根据权利要求1所述的分子设计方法，其特征在于，所述步骤(2)的MD模拟通过GROMACS、AMBER、CHARMM、NAMD、或LAMMPS进行；

优选地，所述步骤(2) MD模拟中，水分子模型选自TIP3P、TIP4P、TIP4P/2005、SPC、TIP3P、TIP5P、或SPC/E，优选TIP4P/2005水分子模型；

优选地，所述步骤(2) MD模拟中，所述力场参数由GROMOS、ESFF、MM形态力场、AMBER、CHARMM、COMPASS、UFF、CVFF等力场中的一种提供。
3. 根据权利要求1或2任一项所述的分子设计方法，其特征在于，所述步骤(2) MD模拟中，模拟计算化合物分子之间的相互作用，化合物分子与水分子的相互作用，化合物分子与冰-水分子的相互作用；例如所述作用包括是否形成氢键、范德华尔斯作用、静电作用、疏水作用、 π - π 作用等。
4. 根据权利要求1-3任一项所述的分子设计方法，其特征在于，所述步骤(2) MD模拟中，所述模拟计算分子相互作用时，对温度和压强进行调节；优选地，采用V-rescale温度控制器和压强控制器调节温度和压强；

优选地，所述步骤(2) MD模拟中，通过选择势能参数以保持化合物分子的分子构型；

优选地，所述步骤(2)中，模拟水溶液体系时，x, y, z三个方向均采用周期性边界条件；模拟冰水混合体系时，x, y两个方向采用周期性边界条件；

优选地，所述步骤(2) MD模拟中，选用立方体或八面体水盒子，优选 $3.9 \times 3.6 \times 1.0 \text{ nm}^3$ 的水盒子。
5. 根据权利要求1-4任一项所述的分子设计方法，其特征在于，所述化合物分子的主链为碳链或者肽链结构。
6. 根据权利要求1-5任一项所述的分子设计方法，其特征在于，所述亲水基团为可与水分子形成非共价作用的官能团，例如可与水形成氢键、范德华尔斯作用、静电作用、疏水作用或者 π - π 作用；例如，所述亲水基团可以选自羟基(-OH)、氨基(-NH₂)、羧基(-COOH)、酰胺基(-CONH₂)中的至少一种，或，例如选自脯氨酸(L-Pro)、精氨酸(L-Arg)、赖氨酸(L-Lys)等亲水氨基酸，葡萄糖酸内酯(GDL)、糖类等化合物分子或其分子片段；

所述亲冰基团为可与冰形成非共价作用的官能团，例如可与冰形成氢键、范德华尔斯作用、静电作用、疏水作用或者 π - π 作用等；示例性地，所述亲冰基团可以选自羟基(-OH)，氨基(-NH₂)，苯基(-C₆H₅)，吡咯烷基(-C₄H₅N)等，或，例如选自谷氨酰胺(L-Gln)、苏氨酸(L-Thr)、天冬氨酸(L-Asn)等亲冰氨基酸，苯环(C₆H₆)，吡咯烷(C₄H₉N)等化合物分子或其分子片段。
7. 根据权利要求1-6任一项所述的分子设计方法，其特征在于，所述控冰材料为含有亲水基团的嵌段与含有亲冰基团的嵌段共价键键合而成，或者为含有亲水基团的分子与含有亲冰基团的分子通过离子键结合。
8. 根据权利要求1-7任一项所述的分子设计方法，其特征在于，所述方法还包括合成所述化合物分子的步骤，例如聚合反应、脱水缩合反应，或者基因工程菌生物发酵等方法合成。
9. 根据权利要求1-8任一项所述的分子设计方法所得的控冰材料。
10. 权利要求9所述的控冰材料，其特征在于，所述控冰材料为间同规整度 r 为45%~60%的PVA，分子量为10kDa~500kDa；优选地，所述PVA间同规整度 r 为50%~55%，分子量为10-30kDa。
11. 一种筛选控冰材料的方法，其特征在于，包括如下步骤：(1)测得所述控冰材料与水的亲和性；(2)测得所述控冰材料在冰水界面的铺展性能。
12. 根据权利要求11所述的筛选控冰材料的方法，其特征在于，所述步骤(1)通过测定所述控冰材料在水中的溶解度、水合常数、分散尺寸、和/或所述控冰材料分子与水分子形成的分子间氢键数的方法测定。
13. 根据权利要求11或12所述的筛选控冰材料的方法，其特征在于，所述步骤(2)为采用冰吸附实验测得所述控冰材料在冰表面的吸附量，

所述控冰材料在冰表面的吸附量=(冰表面所吸附的控冰材料质量 m_1 /含有控冰材料的原溶液中控

冰材料的总质量 m_2) $\times 100\%$ 。

14.根据权利要求11-13任一项所述的筛选控冰材料的方法,其特征在于,所述冰吸附实验包括:

S1: 配制所述控冰材料的水溶液,降温至过冷温度;

S2: 将预冷的控温棒置于所述水溶液中诱导冰层在控温棒表面生长,持续搅拌水溶液,以待控冰材料逐渐吸附于冰层表面,保持控温棒、水溶液温度在过冷温度;

S3: 测定控冰材料在冰表面的吸附量;

优选地,所述控温棒经液氮、干冰、或超低温冰箱冷冻中的任一种进行预冷。

15.根据权利要求11-14任一项所述的筛选控冰材料的方法,其特征在于,所述冰吸附实验过程中,保持过冷度以及吸附时间恒定以此确保所得冰的表面积在误差允许范围内保持不变。

16. 根据权利要求14-15任一项所述的筛选控冰材料的方法,其特征在于,所述步骤S1中控冰材料为预先荧光标记的,例如用荧光素进行标记;

优选地,当所述控冰材料自身具有紫外或荧光光谱吸收特性时,不进行荧光标记。

17.根据权利要求14-16任一项所述的筛选控冰材料的方法,其特征在于,步骤S3包括:

S3a: 将吸附完成的冰块取出,纯水洗涤,融化得到控冰材料吸附溶液;

S3b: 测定融化的控冰材料吸附溶液的体积V,测定所述吸附溶液中控冰材料的质量/体积浓度c,通过公式 $m_1=cV$ 计算得到冰表面所吸附的控冰材料质量 m_1 。

18.根据权利要求17所述的筛选控冰材料的方法,其特征在于,所述S3b中,所述浓度c通过紫外可见光谱法测得。

19.根据权利要求11-18任一项所述的筛选控冰材料的方法,其特征在于,所述方法用于控制冰晶生长材料的筛选。

20.根据权利要求11-19任一项所述的筛选控冰材料的方法,其特征在于,所述方法还包括步骤(3): 评估所述材料与水的亲和性和与冰的亲和性,水亲和性和冰亲和性都强的材料具有良好的控冰性能。

21.一种用于权利要求13或14所述方法的冰吸附实验的装置,包括多层储液腔、控温棒和温度控制器,所述多层储液腔由里到外依次包括冰吸附腔、温浴腔、冷却液储存腔,所述控温棒置于冰吸附腔内,所述控温棒和储液腔的温度由温度控制器控制。

22.根据权利要求21的冰吸附实验装置,所述控温棒为导热材料制成的中空结构,所述控温棒的中空结构设置有进液口和排液口;所述温度控制器为流体温控器,所述温度控制器设置有冷却液流出端和回流端;所述冷却液储存腔两端设置有进液口和排液口;所述温度控制器的冷却液流出端、控温棒的进液口、控温棒的排液口、冷却液储存腔的进液口、冷却液储存腔的排液口以及温度控制器的回流端依次经管道连通,所述管道内流动冷却;

优选,所述多层储液腔设有盖子;

优选,所述冰吸附实验装置在使用时,所述冰吸附腔内盛放控冰材料的水溶液,中层温浴腔装有预定温度的温浴介质例如水浴、冰浴或者油浴等;冷却液温度达到设定温度后,经温度控制器流出,流入中空的控温棒中空结构,对控温棒温度实现控制,随后从控温棒排液口流出,再流入外层冷却液储存腔保持温浴介质的温度在预定水平,再经冷却液储存腔的排液口流经温度控制器的回流端进入温度控制器循环。

23. 一种冷冻保存液,包括权利要求9或10所述的仿生控冰材料。

24.根据权利要求23所述的冷冻保存液,所述仿生控冰材料为聚乙烯醇(PVA),氨基酸或聚氨基酸,和/或肽类化合物的一种或几种的组合;所述冷冻保存液还包括多元醇、水溶性糖(或其衍生物,如水溶性纤维素)和缓冲液。

25. 根据权利要求24所述的冷冻保存液,所述冷冻保存液包括肽类化合物,以每100 mL冷冻保存液计,含有0.1-50 g所述肽类化合物,0-6.0 g的PVA,0-9.0 g的聚氨基酸或氨基酸,0-15 mL的DMSO,5-45 mL的多元醇,0.1-1.0mol L⁻¹的水溶性糖,0-30 mL的血清,余量为缓冲液。

26. 根据权利要求24所述的冷冻保存液,所述冷冻保存液包括聚乙烯醇,以每100 mL冷冻保存液计,含有PVA 0.01-6.0g,0-50 g所述肽类化合物,0-9.0 g的聚氨基酸或氨基酸,0-15 mL的DMSO,5-45 mL的多元醇,0.1-1.0mol L⁻¹的水溶性糖,0-30 mL的血清,余量为缓冲液。

27. 根据权利要求24所述的冷冻保存液,所述冷冻保存液包括氨基酸或聚氨基酸,以每100 mL冷冻保存液计,含有0.1-50 g的氨基酸或聚氨基酸,0-6.0 g的PVA,0-15 mL的DMSO,5-45 mL的多元醇,0.1-1.0mol L⁻¹的水溶性糖,0-30 mL的血清,余量为缓冲液。

28. 根据权利要求27所述的冷冻保存液, 每100 mL冷冻保存液中所述氨基酸和/或聚氨基酸含量为0.5-50 g, 优选1.0-35g, 例如, 当含有氨基酸时, 其含量可以为5.0-35g, 优选为15-25g; 当含有聚氨基酸时, 其含量可以为0.5-9.0g, 优选为1.0-5.0g。

29. 根据权利要求24-28任一项所述的冷冻保存液, 所述多元醇可以为碳原子数为2-5的多元醇, 优选碳原子数2-3的二元醇、和/或三元醇, 例如乙二醇, 丙二醇, 丙三醇中的任一种; 优选乙二醇; 优选每100 mL冷冻保存液中所述多元醇, 含量为5.0-40mL, 例如6.0-20 mL, 9-15 mL。

30. 根据权利要求24-28任一项所述的冷冻保存液, 所述水溶性糖为非还原性双糖、水溶性多糖、水溶性纤维素、糖酐中的至少一种, 例如选自蔗糖、海藻糖、羟丙基甲基纤维素、聚蔗糖。

31. 根据权利要求24-28任一项所述的冷冻保存液, 所述缓冲液可选自DPBS或hepes-buffered HTF, 或其它细胞培养缓冲液中的至少一种。

32. 根据权利要求24-28任一项所述的冷冻保存液, 每100 mL冷冻保存液中所述DMSO含量为0-10 mL, 例如DMSO含量为1.0-7.5 mL;

每100 mL冷冻保存液中所述血清含量为0.1-30 mL, 例如 5.0-20 mL;

每100 mL冷冻保存液中所述水溶性糖含量为0.1-1.0 mol L⁻¹, 例如0.1-0.8 mol L⁻¹;

每100 mL冷冻保存液中所述多元醇含量为5.0-40mL, 例如6.0-20 mL。

33. 根据权利要求23-32任一项所述的冷冻保存液, 所述冷冻保存液的pH为6.5-7.6。

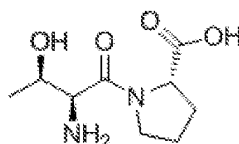
34. 根据权利要求24-32任一项所述的冷冻保存液, 所述PVA选自等规PVA、间规PVA和无规PVA的一种或两种以上的组合, 例如所述PVA的间同规整度为15 %-65 %, 优选所述PVA的间同规整度为45 %-65%的PVA;

35. 根据权利要求34所述的冷冻保存液, 所述PVA可选自分子量为10-500kDa或者更高分子量的PVA。

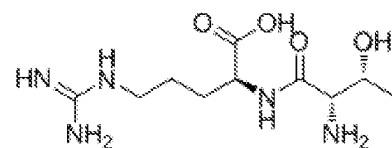
36. 根据权利要求 24-32 任一项所述的冷冻保存液, 所述肽类化合物由亲冰性氨基酸, 如: 苏氨酸 (L-Thr)、谷氨酰胺 (L-Gln)、天冬氨酸 (L-Asn) 等与其他亲水性氨基酸或葡萄糖内酯 (GDL) 或糖反应得到, 所述其他亲水性氨基酸可选自精氨酸、脯氨酸、丙氨酸。

37. 根据权利要求35所述的冷冻保存液, 所述肽类化合物为两个以上的不同种类的氨基酸单元形成的肽类, 如: 2-8个氨基酸单元。

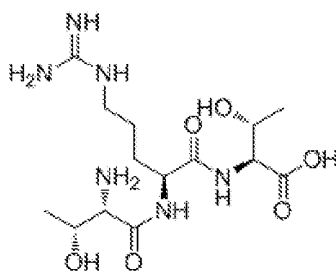
38. 根据权利要求35-37任一项所述的冷冻保存液, 所述肽类化合物具有式 (1) -式 (9) 所示任一结构:



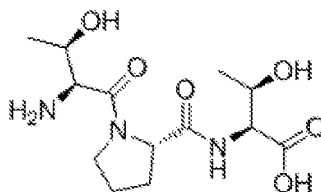
式 (1)



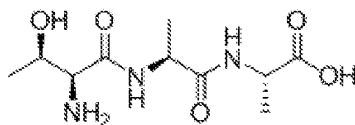
式 (2)



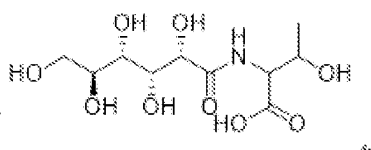
式 (3)



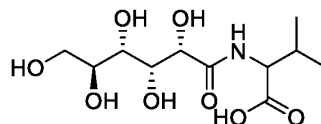
式 (4)



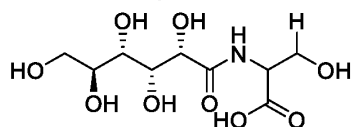
式 (5)



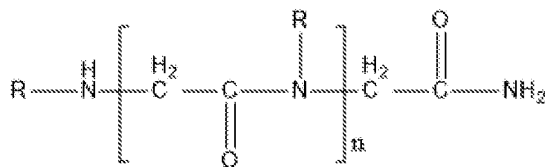
式 (6)



式 (7)



式 (8)



式 (9) ,

其中, 式 (9) 中 R 选自取代或未取代的烷基, 所述取代基可以选自 -OH、-NH₂、-COOH、-CONH₂ 等, 例如, R 为取代或未取代的 C1-6 烷基, 优选 R 为 -CH₃、-CH₂CH₃、-CH₂CH₂COOH; n 为大于等于

1而小于等于1000的整数。

39. 根据权利要求24-32任一项所述的冷冻保存液，所述氨基酸为含有亲冰基团和亲水基团的氨基酸，所述聚氨基酸为含有亲冰基团的氨基酸和含有亲水基团的氨基酸组成的聚氨基酸，所述聚氨基酸优选聚合度为2-40，例如聚合度为6、8、15、20等，例如为聚-L-脯氨酸、聚-L-精氨酸等中的一种或两种以上的组合；所述氨基酸选自精氨酸、苏氨酸、脯氨酸、赖氨酸、组氨酸、谷酰胺酸、天冬氨酸、甘氨酸等中的一种或两种，例如为精氨酸与苏氨酸的组合；或者由上述氨基酸组成的聚氨基酸。

40. 一种冷冻平衡液，以每100mL计，含有多元醇5.0-45 mL，缓冲液 余量。

41. 根据权利要求40所述的冷冻平衡液，其还任选地包括DMSO 0-15 mL，血清0-30mL，和/或PVA 0-5.0 g。

42. 一种冷冻保存试剂，包括权利要求23-39任一项所述的冷冻保存液和权利要求40-41任一项所述的冷冻平衡液。

43. 权利要求23-39任一项所述的冷冻保存液或者权利要求40-41任一项所述的冷冻平衡液或者权利要求42所述的冷冻保存试剂在细胞、组织、器官冷冻保存中的应用。

44. 根据权利要求43所述的应用，所述细胞为生殖细胞或者干细胞，例如生殖细胞选自卵母细胞、精子；所述干细胞选自胚胎干细胞、各类间充质干细胞（例如脐带间充质干细胞、脂肪间充质干细胞、骨髓间充质干细胞等）、造血干细胞。

45. 根据权利要求43所述的应用，所述组织为卵巢组织或胚胎组织。

46. 根据权利要求43所述的应用，所述器官为卵巢组器官。