

一种解冻液及其制备方法与应用

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2019102824210, 发明名称为“一种冷冻保存用解冻液及解冻方法”, 以及专利申请号为2019102824155, 发明名称为“一种解冻液在冷冻保存的卵母细胞或胚胎解冻中的应用”的在先申请的优先权。该两件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, 具体涉及一种冷冻保存用解冻液及解冻方法。

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冷冻。在解冻过程中, 需要注意防止冰晶、冷休克、溶质效应、破碎损伤、重结晶、渗透性休克等冷冻融解损伤, 基于提高胚胎、卵母细胞复苏存活率的考虑, 通常冷冻融解方案为: 采用快速复温的方法, 将高渗透压的囊胚或卵母细胞置于含有一定浓度梯度的冷冻保护剂的培养液中, 从而使得细胞内外的渗透压差距逐渐减小, 减缓细胞体积的变化速度, 避免解冻过程中造成的细胞或胚胎损伤。目前临床广泛使用的解冻试剂大多以蔗糖、血清和缓冲液为主要成分。但上述解冻液在复温过程中不能有效的控制冰晶的生长, 从而损害细胞。除此之外, 目前解冻液因使用成分不明确且包含易变质的血清, 导致解冻液存在保质期短、带入寄生性生物污染物质等问题。

发明内容

为改善现有技术的上述缺陷, 本发明提供一种冷冻保存用解冻液及解冻方法。

本发明通过以下技术方案实现：

一种解冻液，每 100mL 含有仿生控冰材料 0.1-50 g、水溶性糖 0-1.0 mol L⁻¹、缓冲液余量，所述仿生控冰材料为具有亲冰基团和亲水基团的控冰材料。

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、范德华尔斯作用、静电作用、疏水作用或者 π - π 作用；示例性地，所述亲水基团可以选自羟基（-OH）、氨基（-NH₂）、羧酸基（-COOH）、酰胺基（-CONH₂）中的至少一种，或，选自例如脯氨酸（L-Pro），精氨酸（L-Arg），赖氨酸（L-Lys），组氨酸（L-His），甘氨酸（L-Gly），葡萄糖酸内酯（GDL），糖类等化合物分子或其分子片段。

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、范德华尔斯作用、静电作用、疏水作用或者 π - π 作用；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（-C₄H₈N），或，选自例如谷氨酰胺（L-Gln），苏氨酸（L-Thr），天冬氨酸（L-Asn），苯环（-C₆H₆），吡咯烷（-C₄H₉N）等化合物分子或其分子片段。

根据本发明，所述仿生控冰材料选自聚乙烯醇（PVA）、氨基酸、多肽、聚氨基酸中的至少一种或两种以上的组合。

根据本发明，所述氨基酸可以选自精氨酸、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以上的组合；所述聚氨基酸为可选自赖氨酸、精氨酸、脯氨酸、苏氨酸、组氨酸、谷氨酰胺、天冬氨酸、甘氨酸等中至少一种的均聚物（聚合度 ≥ 2 ，优选聚合度为 2~40，例如聚合度为 6、8、15、20 等）。

示例性地，所述多肽为上述氨基酸中的两种以上组成的多肽或者为氨基酸与糖类（例如葡萄糖内酯）反应生成的糖肽衍生物，例如所述多肽是 2-8 个不同的氨基酸组成的多肽，再例如二肽、三肽、四肽等。在本发明的实施方案中，所述多肽为 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）中的一种或两种以上。

根据本发明，所述仿生控冰材料含量为 1.0-50 g、2.0-20 g、5.0-10 g；在一个实施方案中，所述仿生控冰材料含量为 3.0 g、4.0 g、5.0 g、10 g、25g、30g。

作为本发明的一个实施方案，所述仿生控冰材料包括 PVA 1.0-6.0 g。

作为本发明的一个实施方案，所述仿生控冰材料包括氨基酸 1.0-30 g。示例性地，所述氨基酸为精氨酸与苏氨酸组合而成，例如含有精氨酸 1.0-20 g、1.0-10 g、1.0-5 g，含有苏氨酸

1.0-10 g、1.0-5.0 g、1.0-2.5 g。

作为本发明的一个实施方案，所述仿生控冰材料包括聚氨基酸 0.1-9.0 g，例如 1-5.0g。示例性地，所述氨基酸为聚-L-脯氨酸和/或聚-L-精氨酸。

作为本发明的一个实施方案，所述仿生控冰材料包括多肽 1.0-50 g；例如 1.0-25 g、1.0-13 g、1.0-10 g、1.0-5.0 g。

作为本发明的一个实施方案，所述仿生控冰材料是 PVA 与上述氨基酸、多肽、和/或聚氨基酸的组合。

根据本发明，每 100 mL 解冻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；例如 0.25mol L⁻¹，0.5 mol L⁻¹，1.0 mol L⁻¹。

一种解冻试剂，包括解冻液 I、解冻液 II、解冻液 III 和解冻液 IV，所述解冻液 I-IV 具有如上所述解冻液的组成。

根据本发明的解冻试剂，所述解冻液 I—IV 中，仿生控冰材料的浓度梯度没有特别的限定，各解冻液中仿生控冰材料的浓度可以相同或不同；作为一个示例性方案，所述解冻液 I—IV 中，仿生控冰材料的浓度不同，例如所述解冻液 II 中仿生控冰材料的含量为解冻液 I 中的 50%-100%，所述解冻液 III 中仿生控冰材料的含量为解冻液 II 中的 50%-100%。

根据本发明的解冻试剂，所述解冻液 I-IV 中，含有 PVA 1.0-6.0 g；优选地，所述解冻液 I-IV 中，PVA 浓度相同。

根据本发明的解冻试剂，所述解冻液 II 中水溶性糖浓度为解冻液 I 中的 50%-100%，所述解冻液 III 中水溶性糖浓度为解冻液 II 中的 50%-100%，所述解冻液 IV 中，糖浓度为 0。

作为本发明解冻试剂的一个实施方案，所述解冻液 I 以每 100 mL 计，含有氨基酸 1.0-50 g，PVA 1.0-5.0 g，水溶性糖 1.0 mol L⁻¹，缓冲液余量；

所述解冻液 II 以每 100 mL 计，含有氨基酸 1.0-25 g，PVA 1.0-5.0 g，水溶性糖 0.5 mol L⁻¹，缓冲液余量；

所述解冻液 III 以每 100 mL 计，含有氨基酸 1.0-12.5 g，PVA 1.0-5.0 g，水溶性糖 0.25 mol L⁻¹，缓冲液余量；

所述解冻液 IV 以每 100 mL 计，含有氨基酸 0-6.25 g，PVA 1.0-5.0 g，缓冲液余量。

作为本发明解冻试剂的一个实施方案，所述解冻液 I 以每 100 mL 计，含有 PVA 1.0-5.0 g，水溶性糖 1.0 mol L⁻¹，缓冲液余量；

所述解冻液 II 以每 100 mL 计，含有 PVA 1.0-5.0 g，水溶性糖 0.5 mol L⁻¹，缓冲液余量；

所述解冻液 III 以每 100 mL 计, 含有 PVA 1.0-5.0 g, 水溶性糖 0.25 mol L⁻¹, 缓冲液余量;

所述解冻液 IV 以每 100 mL 计, 含有 PVA 1.0-5.0 g, 缓冲液余量。

作为本发明解冻试剂的一个实施方案, 所述解冻液 I 以每 100 mL 计, 含有聚氨基酸 0.1-9.0 g, PVA 1.0-5.0 g, 水溶性糖 1.0 mol L⁻¹, 缓冲液余量;

所述解冻液 II 以每 100 mL 计, 含有聚氨基酸 0.1-4.5 g, PVA 1.0-5.0 g, 水溶性糖 0.5 mol L⁻¹, 缓冲液余量;

所述解冻液 III 以每 100 mL 计, 含有聚氨基酸 0.1-2.3 g, PVA 1.0-5.0 g, 水溶性糖 0.25 mol L⁻¹, 缓冲液余量;

所述解冻液 IV 以每 100 mL 计, 含有聚氨基酸 0-1.2 g, PVA 1.0-5.0 g, 缓冲液余量。

作为本发明解冻试剂的一个实施方案, 所述解冻液 I 以每 100 mL 计, 含有多肽 1.0-50 g, PVA 1.0-5.0 g, 水溶性糖 1.0 mol L⁻¹, 缓冲液余量;

所述解冻液 II 以每 100 mL 计, 含有多肽 1.0-25 g, PVA 1.0-5.0 g, 水溶性糖 0.5 mol L⁻¹, 缓冲液余量;

所述解冻液 III 以每 100 mL 计, 含有多肽 1.0-12.5 g, PVA 1.0-5.0 g, 水溶性糖 0.25 mol L⁻¹, 缓冲液余量;

所述解冻液 IV 以每 100 mL 计, 含有多肽 0-6.25 g, PVA 1.0-5.0 g, 缓冲液余量。

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、糖酐中的至少一种, 例如选自蔗糖、海藻糖; 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 缓冲液或其它细胞培养缓冲液中的至少一种。

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 10-500kDa 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 %。

本发明的解冻液可采用本领域的已知方法配制, 例如:

将仿生控冰材料溶解于一部分缓冲液中, 调节 pH, 将水溶性糖溶解于一部分缓冲液中,

冷却至室温后将两种溶液混合。

一种冷冻保存细胞或组织或器官的解冻方法，包括如下步骤：

将冷冻的细胞或组织或器官放入 37°C 所述解冻液 I 中复苏 3-5 分钟，然后常温下依次放入所述解冻液 II、解冻液 III、解冻液 IV 中各 3-5 分钟。

上述解冻液和解冻试剂可用于冷冻保存的卵母细胞和胚胎、组织或器官的复苏和解冻。例如所述组织或器官为卵巢组织或卵巢器官。

进一步地，本发明提供上述解冻液和解冻试剂的应用，具体而言是在冷冻保存的卵母细胞和胚胎、组织或器官的复苏和解冻中的应用，例如所述组织或器官为卵巢组织或卵巢器官。

有益效果

本发明采用具有亲冰和亲水特性的仿生控冰材料制备的解冻液及解冻试剂，能有效控制冰晶生长，显著改善复苏过程中温度变化对于细胞或组织的损害；且生物相容性好，不含动物血清，毒性小，相比于传统含有血清的解冻液，降低了保质期短、带入寄生性生物污染物质等风险，更有利于维持细胞或组织的传代稳定性。且本发明成分简单，成本低廉，具有良好的应用前景。

附图说明

图 1 为新鲜未冷冻的卵巢器官切片染色照片；

图 2 为卵巢器官经实施例 1 的解冻液解冻后切片染色的照片；

图 3 为新鲜未冷冻的卵巢组织切片染色照片；

图 4 为卵巢组织经实施例 1 的解冻液解冻后切片染色的照片。

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。

本发明实施例中采用的 PVA，间同规整度为 50%-55%，分子量为 13-23 kDa，水解度 98%。

本发明实施例中冷冻保存液中采用聚-L-脯氨酸聚合度为 15，分子量为 1475。解冻液中聚-L-脯氨酸聚合度为 8，分子量为 795。

本发明实施例中采用如下冷冻平衡液和冷冻保存液：

冷冻保存液 A：总体积 100mL，将 2.0 g 的 PVA 在 80℃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 值并用 DPBS 定容补齐余量至总体积 100 mL，备用。

冷冻平衡液 a：总体积 100mL，将 2.0g 的 PVA 在 80℃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 值并用 DPBS 定容补齐余量至总体积 100 mL，备用。

冷冻保存液 B：总体积 100mL，将 2.0 g 的 PVA 在 80℃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，再将三种溶液混匀，调节 pH 值并用 DPBS 定容补齐余量至总体积 100 mL，备用。

冷冻平衡液 b：与冷冻平衡液 a 组成相同，总体积 100mL，将 2.0g 的 PVA 在 80℃水浴中加热并磁力搅拌溶于 40mL 的 DPBS 中，待 PVA 全部溶解，调节 pH 为 7.0，加入 7.5mL 的乙二醇，混匀，调节 pH 值并用 DPBS 定容补齐余量至总体积 100 mL，备用。

冷冻保存液 C：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。

冷冻平衡液 c：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。

实施例 1

解冻液 I 每 100mL 含有如下组分

物质	含量
PVA (mg mL ⁻¹)	20
蔗糖 (mol L ⁻¹)	1.0
DPBS (V)	余量

解冻液 II 每 100mL 含有如下组分

物质	含量
----	----

PVA (mg mL ⁻¹)	20
蔗糖 (mol L ⁻¹)	0.5
DPBS (V)	余量

解冻液III每 100mL 含有如下组分

物质	含量
PVA (mg mL ⁻¹)	20
蔗糖 (mol L ⁻¹)	0.25
DPBS (V)	余量

解冻液IV 每 100mL 含有如下组分

物质	含量
PVA (mg mL ⁻¹)	20
DPBS (V)	余量

实施例 2

解冻液I 每 100mL 含有如下组分

物质	含量
聚-L-脯氨酸/ (mg mL ⁻¹)	10
PVA (mg mL ⁻¹)	20
蔗糖 (mol L ⁻¹)	1.0
DPBS (V)	余量

解冻液II 每 100mL 含有如下组分

物质	含量
聚-L-脯氨酸/ (mg mL ⁻¹)	5.0
PVA (mg mL ⁻¹)	20
蔗糖 (mol L ⁻¹)	0.5
DPBS (V)	余量

解冻液III 每 100mL 含有如下组分

物质	含量
聚-L-脯氨酸/ (mg mL ⁻¹)	2.5

PVA (mg mL^{-1})	20
蔗糖 (mol L^{-1})	0.25
DPBS (V)	余量

解冻液IV 每 100mL 含有如下组分

物质	含量
PVA (mg mL^{-1})	20
DPBS (V)	余量

对比例 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: 含有 0 mol L^{-1} 蔗糖, 20%的血清, 余量为 DPBS。

应用例 1 冷冻卵母细胞的解冻

本发明所用卵母细胞冷冻保存方法具体为卵母细胞先置于冷冻平衡液中平衡 5 分钟, 然后置于上述冷冻保存液中平衡 45 秒, 将已在冷冻保存液中平衡的卵母细胞放置于冷冻载杆上, 然后快速投入液氮 (-196°C) 中, 并封闭载杆后继续保存。

采用上述实施例 1、2 中的配方和对比例 1 所制备的解冻用试剂对小鼠的卵母细胞进行解冻, 卵母细胞解冻方法具体为从液氮中快速取出卵母细胞放入 37°C 解冻液I中 3 至 5 分钟, 后常温下依次放入解冻液II、解冻液III、解冻液IV中各 3 分钟, 然后将卵母细胞放入培养基中, 置于 37°C 、5% 二氧化碳培养箱中培养 2 小时, 观察卵母细胞存活率 (表 1)。

应用例 2 冷冻胚胎的解冻

本发明所用胚胎冷冻保存方法具体为胚胎先置于冷冻平衡液中平衡 8 分钟, 然后置于上述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。

采用上述实施例 1、2 中的配方和对比例 1 所制备的解冻用试剂对小鼠的胚胎进行解冻, 胚胎解冻方法具体为从液氮中快速取出胚胎放入 37°C 解冻液I中 3 至 5 分钟, 后常温下依次放入解冻液II、解冻液III、解冻液IV中各 3 分钟, 然后将胚胎放入培养基中, 置于 37°C 、5% 二氧化碳培养箱中培养 2 小时, 观察胚胎存活率 (表 2)。

本发明实施例中存活率为 3-12 次重复实验的存活率平均值。

表 1 解冻液解冻小鼠卵母细胞的存活率对比

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 1	a	A	实施例 1	53	96.5
应用实例 2	b	B	实施例 2	60	98.6
应用实例 3	c	C	实施例 1	44	94.7
对比实例 1	a	A	对比例 1	50	93.4
对比实例 2	b	B	对比例 1	39	89.7
对比实例 3	c	C	对比例 1	96	81.9

表 2 解冻液解冻小鼠胚胎的存活率对比

编号	平衡液	冷冻液	解冻液	胚胎总数	2 小时后存活率 %
对比实例 4	c	C	对比例 1	39	82.0
应用实例 4	b	B	实施例 2	39	97.4
应用实例 5	a	A	实施例 1	37	97.1

由表 1 和表 2 数据可以看出，本发明解冻试剂解冻卵母细胞存活率均达到 94% 以上，可高达 98.6%，解冻胚胎存活率达 97% 以上，远高于对比例 1（商业化解冻液）的胚胎解冻存活率，表明该解冻试剂优于常规玻璃化解冻液解冻卵母细胞和胚胎的有效性。而且本发明的解冻试剂不加入血清，减少了寄生性生物污染物质等风险，更有利于维持细胞或组织的传代稳定性。

应用例 3 完整卵巢器官或卵巢组织切片冷冻后的解冻

采用上述冷冻平衡液 a 以及冷冻保存液 A 的组合分别对新生 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，然后采用上述实施例 1 的解冻液进行解冻。冷冻和解冻过程如下：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°C、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 1-4 所示，其中图 1 为新鲜未冷冻的卵巢器官切片染色照片，图 2 为卵巢器官

经实施例 1 的解冻液解冻后切片染色的照片；图 3 为新鲜未冷冻的卵巢组织切片染色照片，图 4 为卵巢组织经实施例 1 的解冻液解冻后切片染色的照片。可见，经实施例 1 的解冻液解冻后，卵巢器官或卵巢组织的卵泡结构相对完整，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，达到良好的复苏效果。

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

1.一种解冻液,其特征在于:每 100mL 解冻液含有仿生控冰材料 0.1-50 g、水溶性糖 0-1.0 mol L⁻¹、缓冲液余量,所述仿生控冰材料为具有亲冰基团和亲水基团的控冰材料;所述亲水基团为可与水分子形成非共价作用的官能团或分子,所述亲冰基团为可与冰形成非共价作用的官能团或分子。

2.根据权利要求 1 所述的解冻液,其特征在于,所述亲水基团与水形成氢键、范德华尔斯作用、静电作用、疏水作用或者 π - π 作用;示例性地,所述亲水基团选自羟基(-OH)、氨基(-NH₂)、羧基(-COOH)、酰胺基(-CONH₂)中的至少一种,或,选自例如脯氨酸(L-Pro),精氨酸(L-Arg),赖氨酸(L-Lys),葡萄糖酸内酯(GDL),糖类等化合物分子或其分子片段;

优选,所述亲冰基团与冰形成氢键、范德华尔斯作用、静电作用、疏水作用或者 π - π 作用;示例性地,所述亲冰基团选自羟基(-OH),氨基(-NH₂),苯基(-C₆H₅),吡咯烷基(-C₄H₈N),或,选自例如谷氨酰胺(L-Gln),苏氨酸(L-Thr),天冬氨酸(L-Asn),组氨酸(L-His),甘氨酸(L-Gly),苯环(C₆H₆),吡咯烷(C₄H₉N)等化合物分子或其分子片段。

3.根据权利要求 1 或 2 所述的解冻液,其特征在于,所述仿生控冰材料选自聚乙烯醇 PVA、氨基酸、多肽、聚氨基酸中的至少一种或两种以上的组合;

优选,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以上的组合;所述聚氨基酸为选自赖氨酸、精氨酸、脯氨酸、苏氨酸、组氨酸、谷氨酰胺、天冬氨酸、甘氨酸等中至少一种的均聚物(聚合度 ≥ 2 ,优选聚合度为 2-40,例如聚合度为 6、8、15、20 等);

优选,所述多肽为两种以上的氨基酸组成或者为氨基酸与糖类组成的糖肽衍生物,例如为 2-8 个不同的氨基酸组成,优选地所述多肽为 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)中的一种或两种以上;

优选,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 %,优选间同规整度 45 %-65 %;

优选, 所述 PVA 选自分子量为 10-500kDa 或者更高分子量的 PVA; 优选 PVA 水解度为 80%-99%、82-87%、87%-89%、89%-99%、98%-99%。

4. 根据权利要求 1-3 任一项所述的解冻液, 其特征在于, 所述仿生控冰材料含量为 1.0-30 g;

优选, 所述仿生控冰材料包括 PVA 1.0-6.0 g;

优选, 所述仿生控冰材料包括氨基酸 1.0-30 g, 更优选, 所述氨基酸为精氨酸与苏氨酸组合而成;

优选, 所述仿生控冰材料包括聚氨基酸 0.1-9.0 g;

优选, 所述仿生控冰材料包括多肽 1.0-50 g;

优选, 所述仿生控冰材料是 PVA 与所述氨基酸、多肽、和/或聚氨基酸的组合。

5. 根据权利要求 1-4 任一项所述的解冻液, 其特征在于, 每 100 mL 解冻液中所述水溶性糖含量为 0.1-1.0 mol L⁻¹;

优选, 所述水溶性糖可以为非还原性双糖、水溶性多糖、糖酐中的至少一种, 例如选自蔗糖、海藻糖、水溶性纤维素(例如羟丙基甲基纤维素)、聚蔗糖;

优选, 所述缓冲液可选自 DPBS 或 hepes-buffered HTF 缓冲液或其他细胞缓冲液中的至少一种。

6. 一种解冻试剂, 其特征在于, 包括解冻液 I、解冻液 II、解冻液 III 和解冻液 IV, 所述解冻液 I-IV 具有如权利要求 1-5 任一项所述解冻液的组成。

7. 根据权利要求 6 所述的解冻试剂, 其特征在于, 优选, 所述解冻液 II 中水溶性糖浓度为解冻液 I 中的 50%-100%, 所述解冻液 III 中水溶性糖浓度为解冻液 II 中的 50%-100%, 所述解冻液 IV 中, 水溶性糖浓度为 0; 优选, 所述解冻液 I-IV 中, 例如仿生控冰材料的浓度相同或不同, 例如解冻液 II 中仿生控冰材料浓度为解冻液 I 中的 50%-100%, 所述解冻液 III 中仿生控冰材料浓度为解冻液 II 中的 50%-100%, 所述解冻液 IV 中, 仿生控冰材料浓度为 0;

优选, 所述解冻液 I-IV 中, 含有 PVA 1.0-6.0g; 优选地, 所述解冻液 I-IV 中, PVA 浓度相同;

8. 根据权利要求 6 或 7 所述的解冻试剂, 其特征在于, 所述解冻试剂中, 所述解冻液 I 以每 100 mL 计, 含有氨基酸、或者多肽中的至少一种 1.0-50 g, PVA 1.0-5.0 g, 水溶性糖 1.0 mol L⁻¹, 缓冲液余量;

所述解冻液 II 以每 100 mL 计,含有氨基酸、或者多肽中的至少一种 1.0-25 g, PVA 1.0-5.0 g, 水溶性糖 0.5 mol L^{-1} , 缓冲液余量;

所述解冻液 III 以每 100 mL 计, 含有氨基酸、或者多肽中的至少一种 1.0-12.5g, PVA 1.0-5.0 g, 水溶性糖 0.25 mol L^{-1} , 缓冲液余量;

所述解冻液 IV 以每 100 mL 计, 含有氨基酸、或者多肽中的至少一种 0-6.25 g, PVA 1.0-5.0 g, 缓冲液余量。

9. 根据权利要求 6 或 7 所述的解冻试剂, 其特征在于, 所述解冻液 I 以每 100 mL 计, 含有 PVA 1.0-5.0 g, 水溶性糖 1.0 mol L^{-1} , 缓冲液余量;

所述解冻液 II 以每 100 mL 计, 含有 PVA 1.0-5.0 g, 水溶性糖 0.5 mol L^{-1} , 缓冲液余量;

所述解冻液 III 以每 100 mL 计, 含有 PVA 1.0-5.0 g, 水溶性糖 0.25 mol L^{-1} , 缓冲液余量;

所述解冻液 IV 以每 100 mL 计, 含有 PVA 1.0-5.0 g, 缓冲液余量;

优选, 所述解冻液 I 以每 100 mL 计, 含有聚氨基酸 0.1-9.0 g, PVA 1.0-5.0 g, 水溶性糖 1.0 mol L^{-1} , 缓冲液余量;

所述解冻液 II 以每 100 mL 计, 含有聚氨基酸 0.1-4.5 g, PVA 1.0-5.0 g, 水溶性糖 0.5 mol L^{-1} , 缓冲液余量;

所述解冻液 III 以每 100 mL 计, 含有聚氨基酸 0.1-2.3 g, PVA 1.0-5.0 g, 水溶性糖 0.25 mol L^{-1} , 缓冲液余量;

所述解冻液 IV 以每 100 mL 计, 含有聚氨基酸 0-1.2 g, PVA 1.0-5.0 g, 缓冲液余量。

10. 一种冷冻保存细胞或组织的解冻方法, 包括如下步骤:

将冷冻的细胞或组织放入 37°C 如权利要求 6-9 任一项所述解冻液 I 中复苏 3-5 分钟, 然后常温下依次放入权利要求 6-9 任一项所述解冻液 II、解冻液 III、解冻液 IV 中各 3-5 分钟。

11. 权利要求 1-5 任一项所述的解冻液或者权利要求 6-9 任一项所述解冻试剂的应用, 其应用于冷冻保存的卵母细胞和胚胎、组织或器官的复苏和解冻, 例如所述组织或器官为卵巢组织或卵巢器官。