

一种无 DMSO 的冷冻保存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 201910281978.2, 发明名称为“一种无 DMSO 的冷冻保存液及其制备方法”的在先申请, 以及专利申请号为 201910281986.7, 发明名称为“一种肽类化合物和含有该化合物的冷冻保存液”的在先申请的优先权。上述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, 具体涉及一种无 DMSO 的冷冻保存液及其制备方法。

背景技术

冷冻保存技术自问世以来, 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。随着生活水平的提高和医学技术的发展, 人类生殖细胞(精子、卵母细胞)、性腺组织等的冷冻保存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、组织以及器官资源已成为生命科学领域的重要课题。

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。二甲基亚砜(DMSO)是体外细胞培养常用的助熔剂和渗透类细胞冻存保护剂, 然而, DMSO 在临床患者试验时产生不良副作用; 同时 DMSO 还具有强的细胞毒性, 且不同种类的细胞对于 DMSO 浓度的敏感性不同, 导致 DMSO 为主要保护剂成分的冻存试剂对细胞的毒副作用, 其应用受到限制。目前玻璃化冷冻方法通常使用的高浓度($\geq 15\%$)的 DMSO, 严重影响冷冻保存对象复苏后的存活率甚至(子代)安全性以及功能表达。综上, 目前采用的冷冻保存试剂存在不具备复温过程中有效控制冰晶生长的能力, 同时存在试剂毒性大的问题。

发明内容

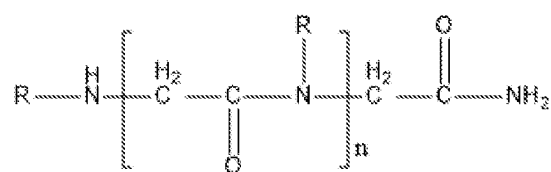
为改善现有技术的上述缺陷, 本发明提供一种无 DMSO 的冷冻保存液及其制备方法。

本发明提供如下技术方案:

一种无 DMSO 的冷冻保存液, 以每 100 mL 体积计, 含有仿生控冰材料 0.01-50.0g, 多元醇 5.0-45mL, 水溶性糖 0.1-1mol L⁻¹, 血清 0-30mL, 余量为缓冲液, 所述仿生控冰材料选自聚乙烯醇 PVA 和/或氨基酸类仿生控冰材料, 所述冷冻保存液中不含有二甲基亚砷 (DMSO)。

根据本发明, 所述氨基酸类仿生控冰材料选自聚氨基酸 (聚合度 ≥ 2 , 优选聚合度为 8-40, 例如聚合度为 8、15、20 等)、氨基酸、肽类化合物中的一种或两种以上。

根据本发明, 所述肽类化合物为多肽 (优选 2-8 个不同的氨基酸组成的肽, 例如 2 肽、3 肽、4 肽)、糖肽衍生物、式 (I) 所示化合物,



式 (I),

其中, R 选自取代或未取代的烷基, 所述取代的基团可以选自 -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。

根据本发明, 所述多元醇可以为 C₂₋₅ 的多元醇, 优选 C₂₋₃ 的二元醇、三元醇, 例如乙二醇, 丙二醇, 丙三醇中的任一种。

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、聚蔗糖、羟丙基甲基纤维素。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, 所述缓冲液可以为 DPBS、hepes-buffered HTF 缓冲液、其他细胞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入血清白蛋白或其替代物, 例如十二烷基磺酸钠 SDS, 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。

根据本发明的冷冻保存液, 所述仿生控冰材料可以为 PVA, 所述 PVA 含量为 0.1-6.0 g, 例如 0.5-5.0 g; 具体地, 可以为 1.0 g、2.0 g、3.0 g、4.0 g。

根据本发明的冷冻保存液,所述仿生控冰材料可以为聚氨基酸或氨基酸,所述聚氨基酸或氨基酸的含量为 0.01-50 g,例如 1.5-50 g;具体地,可以为 8.0 g、10 g、15g、20g、30g、40g。

根据本发明的冷冻保存液,所述控冰材料可以为 PVA 与聚氨基酸的组合,例如由 0.1-5.0g 的 PVA 和 1.0-9.0g 的聚氨基酸组成。

根据本发明的冷冻保存液,所述控冰材料可以为 PVA 与氨基酸的组合,例如由 0.1-5.0g 的 PVA 和 8.0-35g 的氨基酸组成。

根据本发明的冷冻保存液,以每 100mL 计,所述多元醇含量为 6.0-28 mL,例如 7.0-20 mL, 10-15 mL。

根据本发明的冷冻保存液,以每 100mL 计,所述血清含量为 0.1-30mL,例如 5.0-20 mL, 10-15 mL。

根据本发明的冷冻保存液,所述冷冻保存液以每 100mL 计,优选血清含量为 0;

根据本发明的冷冻保存液,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。

根据本发明的冷冻保存液,其 pH 为 6.5-7.6,例如为 6.9-7.2。

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 0.01-6.0 g

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,由如下组分组成:

PVA 1.0-6.0 g

乙二醇 5-30 mL

血清 0.1-20 mL

蔗糖 0.2-0.8 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,由如下组分组成:

PVA 1.0-5.0 g

多元醇 10-45 mL

水溶性糖 0.1-1.0 mol L⁻¹

缓冲液 余量。

优选，以每 100 mL 体积计，由如下组分组成：

PVA 1.0-5.0 g

乙二醇 10-30 mL

蔗糖 0.2-0.8 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，由如下组分组成：

氨基酸 2.0-50 g

PVA 0.1-6 g

多元醇 10-30 ml

水溶性糖 0.1-1.0 mol L⁻¹

血清 10-20 ml

缓冲液 余量。

优选，所述冷冻保存液以每 100 mL 体积计，由如下组分组成：

L-Arg 5.0-18 g

L-Thr 3.0-12 g

PVA 1.0-6.0 g

乙二醇 10-20 ml

蔗糖 0.2-0.8 mol L⁻¹

血清 10-20ml

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，由如下组分组成：

聚氨基酸 0.1-9.0 g

PVA 0.01-6.0 g

多元醇 10-30ml

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，由如下组分组成：

聚脯氨酸或聚精氨酸 0.1-5.0 g

PVA 1.0-6.0 g

乙二醇 10-20ml

蔗糖 0.2-0.8 mol L⁻¹

DPBS 余量。

本发明还提供所述冷冻保存液的制备方法，包括如下步骤：将仿生控冰材料溶解于 DPBS 中，冷却到室温后调节 pH，将除血清外的其他组分溶解于剩下的 DPBS 中，冷却后混合，再次确认或调节 pH 并补齐余量缓冲液，血清于使用时加入。

根据本发明的制备方法，包括如下步骤：

- (1) 将 PVA 溶解于一部分缓冲液中，冷却到室温后调节 pH，得到溶液 1；
- (2) 任选地，将聚氨基酸或氨基酸溶解于一部分缓冲液，冷却到室温后调节 pH，形成溶液 2；
- (3) 将水溶性糖溶解于另一部分缓冲液中，待水溶性糖全部溶解后加入除血清的其他组分，制得溶液 3；
- (4) 待溶液 1、任选地溶液 2、和溶液 3 冷却至室温后混合，调节 pH 值并定容补足余量缓冲液至预定体积，得到所述冷冻保存液。

根据本发明的制备方法，包括如下步骤：

- (1) 将聚氨基酸或氨基酸溶解于一部分缓冲液，冷却到室温后调节 pH，形成溶液 1；
- (2) 任选地，将 PVA 溶解于一部分缓冲液中，冷却到室温后调节 pH，得到溶液 2；
- (3) 将水溶性糖溶解于另一部分缓冲液中，待水溶性糖全部溶解后加入除血清的其他组分，制得溶液 3；
- (4) 待溶液 1、任选地溶液 2、和溶液 3 冷却至室温后混合，调节 pH 值并定容补足余量缓冲液至预定体积，得到所述冷冻保存液。

根据本发明的制备方法，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，所述步骤 (1) 中，PVA 在温浴加热中溶解，例如油浴或水浴加热；例如水浴温度为 60-95°C，优选 80°C。所述步骤 (1) 中，所述溶解包括搅拌步骤。

根据本发明的制备方法，所述步骤 (2) 中，所述溶解为超声辅助溶解。

一种无 DMSO 的冷冻平衡液，以每 100 mL 体积计，含有 PVA 0-5.0 g，多元醇 5.0-45mL，血清 0-30 mL，缓冲液 余量。

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。

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7.0-20 mL, 10-15 mL。

根据本发明的冷冻平衡液,所述血清含量为0.1-30mL,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。

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

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

本发明的冷冻平衡液中,所述PVA、多元醇和血清可从冷冻保存液相应组分的种类中选择。

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溶液中,血清单独存放,在使用时添加。

一种无DMSO的冷冻保存用试剂,包括上述冷冻平衡液和上述冷冻保存液,所述冷冻平衡液和冷冻保存液分别独立存在。

根据本发明的冷冻保存用试剂,所述冷冻保存液的血清含量为0,所述冷冻平衡液以每100 mL体积计,含有PVA 1.0-5.0g,多元醇7.5-15mL, 缓冲液 余量。

根据本发明的冷冻保存用试剂,所述冷冻平衡液以每100mL体积计,包括如下组分:

PVA 0-5.0 g

聚氨基酸 0-15 g

多元醇 5.0-45 mL

血清 0-30 mL

缓冲液 余量;

所述冷冻保存液以总体积100mL计,包括如下组分:

PVA 0.01-6.0 g

氨基酸或聚氨基酸 0-50 g

多元醇 5.0-45 mL

血清 0-30 mL

水溶性糖 0.1-1.0 mol L⁻¹

缓冲液 余量。

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%-60%, 优选 45%-60%, 例如为 50%-55%。

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 10-30kDa、30-50 kDa、80-90 kDa、200-500 kDa。

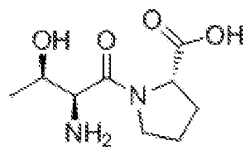
根据本发明, 所述 PVA 可选自水解度为大于 80% 的 PVA, 例如水解度为 80%-99%、82-87%、87%-89%、89%-99%、98%-99%。

根据本发明, 所述聚氨基酸可选自赖氨酸、精氨酸、脯氨酸、苏氨酸、组氨酸、谷酰胺、天冬氨酸、甘氨酸等中至少一种的均聚物(聚合度 ≥ 2)。

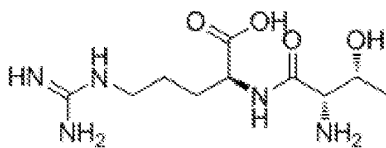
根据本发明, 所述肽类化合物为多肽, 是由两种以上的氨基酸组成, 可选自 L-Thr-L-Arg (TR), L-Thr-L-Pro (TP), L-Arg-L-Thr (RT), L-Pro-L-Thr (PT), L-Thr-L-Arg-L-Thr (TRT), L-Thr-L-Pro-L-Thr(TPT), L-Ala-L-Ala-L-Thr(AAT)中的一种或两种以上。可采用本领域已知的多肽合成方法, 例如采用固相合成法合成这些多肽。

根据本发明, 所述糖肽衍生物为糖类与氨基酸合成, 例如为葡萄糖内酯(GDL)与亲冰氨基酸通过化学键合而组成的分子, 例如: GDL-L-Thr, GDL-L-Gln, GDL-L-Asn, GDL-L-Phe, GDL-L-Tyr, GDL-L-Thr 等。可采用本领域已知的糖类与氨基酸的反应方法制备所述糖肽化合物, 例如采用固相合成法或者使糖类和氨基酸在有机溶剂中反应。

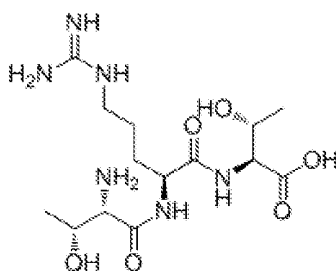
根据本发明, 所述肽类化合物具有式(1)-式(8)所示任一结构:



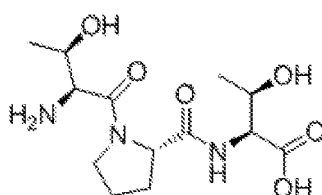
式(1)



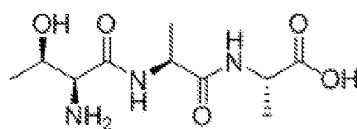
式(2)



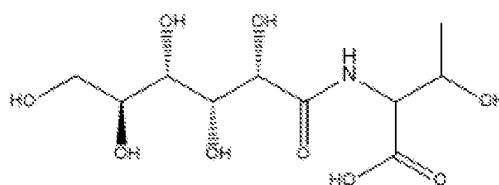
式 (3)



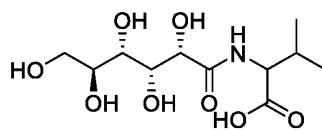
式 (4)



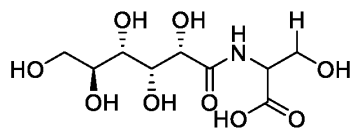
式 (5)



式 (6)

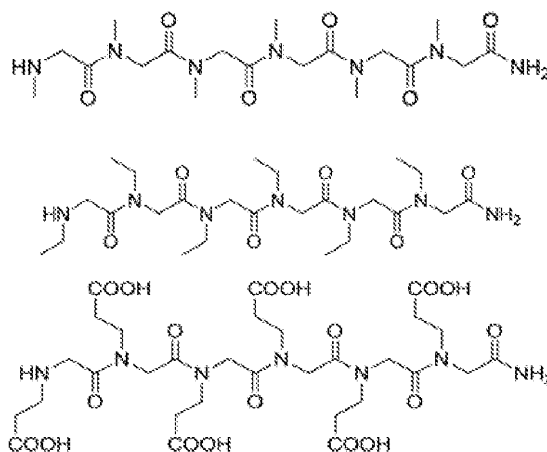


式 (7)

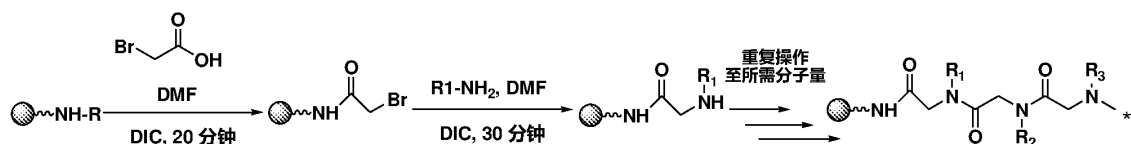


式 (8)。

根据本发明，所述式 (I) 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：



本发明冷冻保存液和冷冻平衡液中，各组分用量均以 100mL 溶液总体积为基准，余量为缓冲液。

本发明还提供上述冷冻保存液在冷冻保存各类细胞、器官以及组织的应用，包括冷冻保存卵母细胞、胚胎、各类干细胞、器官和组织。其中器官和组织包括但不限于卵巢器官、卵巢组织。

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，“干细胞”的种类没有特别的限定，本发明的冷冻保存液可用于冷冻保存本领域已知的各类干细胞，包括但不限于脐带间充质干细胞、骨髓间充质干细胞、脂肪间充质干细胞、造血干细胞等。

本发明中，生物组织可以是来源于动物，包括温血哺乳动物，例如人和灵长类动物；鸟类；驯养的家养或农场动物，例如猫、狗、绵羊、山羊、牛、马和猪；实验室动物，例如小鼠、大鼠和豚鼠；鱼；爬行动物；动物园动物和野生动物等。

有益效果

本发明提供的冷冻保存液和冷冻平衡液，不含有DMSO，在用于冷冻保存小鼠卵母细胞、胚胎时，能达到与商业化冷冻保存液（含有体积浓度为15%DMSO）同等甚至更高的细胞、组织存活率和功能表达稳定性，具有较高的保存效率。其中，既无DMSO也无血清的冷冻保存液，进一步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稳定性差，易带入寄生性生物污染物质等问题。本发明的冷冻保存液组成简单，且原料来源方便，成本低廉，可广泛应用于卵母细胞、类细胞（例如胚胎等）、干细胞、组织以及器官冷冻保存。

附图说明

图1为新生3天的小鼠新鲜（未冷冻）卵巢器官切片染色图片；

图2为对比实例7冻存的完整卵巢器官解冻后切片染色图片；

图3为应用实例14冻存的完整卵巢器官解冻后切片染色图片；

图4为应用实例15冻存的完整卵巢器官解冻后切片染色图片；

图5为应用实例16冻存的卵巢器官解冻后切片染色图片；

图 6 为性成熟的小鼠新鲜（未冷冻）卵巢组织切片染色图片；

图 7 为对比实例 8 冻存的卵巢组织切片解冻后切片染色图片；

图 8 为应用实例 17 冻存的卵巢组织切片解冻后切片染色图片；

图 9 为应用实例 18 冻存的卵巢组织切片解冻后切片染色图片；

图 10 为应用实例 19 冻存的卵巢组织切片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。

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

本发明实施例中冷冻液中采用聚-L-脯氨酸聚合度为 8 或者 15，分子量为 795 和 1475；聚 L-精氨酸聚合度为 8，分子量为 1267。解冻液中聚-L-脯氨酸聚合度为 8，分子量为 795。

本发明实施例中存活率为 3-12 次重复实验的存活率平均值。

实施例 1. 小鼠卵母细胞和胚胎冷冻保存

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	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

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 1.5 g 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; 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, 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 为 7.0, 并用 DPBS 定容补齐余量至总体积 100 mL, 备用。

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

冷冻保存液配液步骤: 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 值为 7.1 并用 DPBS 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 中含有如下组分:

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

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 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

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。

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 2.0 g 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 的乙二醇, 混匀, 用 DPBS 定容至 100mL, 备用。

冷冻平衡液 b: 总体积 100 mL, 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。

对比例 1:

冷冻平衡液 1#: 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 b: 每 1mL 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。

本发明实施例 1 和对比例 1 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 1.0 mol 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 1.0 mol 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:

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。

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; 然后置于所制备的冷冻保存液中 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, 然后置于所制备的冷冻保存液中 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, 将冷冻的胚胎置于 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#	39	89.7%
应用实例 2	a	A	解冻液 3#	60	98.6%
应用实例 3	b	B	解冻液 1#	109	94.8%
应用实例 4	b	C	解冻液 1#	90	97.7%
应用实例 5	a	D	解冻液 1#	50	93.4%
应用实例 6	a	D	解冻液 2#	53	96.5%
对比实例 1	平衡液 1#	冷冻液 1#	解冻液 1#	146	95
对比实例 2	b	冷冻液 2#	解冻液 1#	96	81.9%

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 7	a	A	解冻液 1#	42	95.2%
应用实例 8	a	D	解冻液 1#	41	95.8%
对比实例 3	平衡液 1#	冷冻液 1#	解冻液 1#	38	94.3%
对比实例 4	b	冷冻液 2#	解冻液 1#	39	82.4%

根据实施例 1 和对比例 1 中各实例的数据可以看出,本发明无 DMSO 的冷冻保存液和冷冻平衡液,通过各个组分协同作用,即便在不添加 DMSO 的情况下,用于卵母细胞和胚胎的冷冻保存均仍有良好的保存效果,解决了现有冻存液中因加入较大浓度的 DMSO 对于细胞或胚胎产生毒性的缺陷。而且由应用实例 2, 6-8 可以看出,即便在平衡液,冷冻液以及解冻液同时不加血清以及 DMSO 的情况下,在本发明中的仿生控冰材料和渗透性保护剂乙二醇等共同作用下,仍能达到优于现有商业化冻存液的冷冻保存卵母细胞和胚胎的存活率,进一步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、易带入寄生性生物污染物质等问题。

实施例 2: 人脐带间充质干细胞的冷冻保存

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 E: 总体积 100mL, 含有乙二醇 10mL、血清 20mL、蔗糖 17g (0.5mol L^{-1})、聚 L-精氨酸 (聚合度为 8) 4.0g、PVA 1.0g、DPBS 余量。

冷冻保存液 F: 总体积 100mL, 含有乙二醇 20mL、血清 20mL、蔗糖 17g (0.5mol L^{-1})、L-Arg 16g、L-Thr 8.0 g、DPBS 余量。

冷冻保存液 G: 总体积 100mL, 含有乙二醇 10mL、血清 20mL、蔗糖 17g (0.5mol L^{-1})、PVA 2.0g、DPBS 余量。

冷冻保存液 H: 总体积 100mL, 含有乙二醇 10mL、血清 20mL、蔗糖 17g (0.5mol L^{-1})、TR 28g、DPBS 余量。

冷冻保存液 I: 总体积 100mL, 含有乙二醇 10mL、蔗糖 17g (0.5mol L^{-1})、PVA 2.0 g、DPBS 余量。

冷冻保存液配制方法同实施例 1。

其中, TR 的制备方法如下:

(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, $105\sim 110^{\circ}\text{C}$ 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, $105\sim 110^{\circ}\text{C}$ 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, $105\sim 110^{\circ}\text{C}$ 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]⁺。

对比例 2:

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 a-MEM 培养基 (USA, Invitrogen, C12571500BT)。

采用上述冷冻保存液按表 3 中的方案分别进行人脐带充间质干细胞的冷冻保存。所用脐带干细胞冷冻保存方法具体为微滴法: 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 1.5ml 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 摄氏度)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 的 a-MEM 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 9	冷冻保存液 E	微滴法	92.4%
应用实例 10	冷冻保存液 F	微滴法	71.0%
应用实例 11	冷冻保存液 G	微滴法	72.2%
应用实例 12	冷冻保存液 H	微滴法	75.1%
应用实例 13	冷冻保存液 I	微滴法	77.1%
对比实例 5	冷冻保存液 3#	微滴法	76.6%
对比实例 6	冷冻保存液 1#	微滴法	63.9%

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%（应用实例9），甚至在完全不添加DMSO和血清时，存活率可达到77.1%（应用实例13），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5）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。

实施例3：完整卵巢器官和卵巢组织切片的冷冻保存

冷冻保存液J：总体积 100mL，含有乙二醇 10mL、蔗糖 17g (0.5mol L^{-1})、PVA 2.0g、DPBS 余量。

冷冻保存液K：总体积 100mL，含有乙二醇 10mL、血清 20mL、蔗糖 17g (0.5mol L^{-1})、PVA 1.0g、DPBS 余量。

冷冻保存液L：含有乙二醇 10mL、血清 20mL、蔗糖 17g (0.5mol L^{-1})、聚L-精氨酸（聚合度为8）4.0g、PVA 1.0g、DPBS 余量。

对比例3：冷冻保存液 每1 mL中含有15%（v/v）的DMSO，15%（v/v）的乙二醇，20%（v/v）的血清，0.5M蔗糖，余量为DPBS。

冷冻平衡液a：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值并定容补齐余量至100mL，备用。

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3：

冷冻平衡液1#：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， 0.5mol L^{-1} 蔗糖，余量为DPBS。

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 1.0 mol 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)。

采用上述冷冻保存液及对比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 天内的小鼠完整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°C 、5% CO_2 培养箱中复苏 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 1-10 所示, 图 1 为新鲜未冷冻的卵巢器官切片照片, 图 6 为新鲜未冷冻的卵巢组织的切片照片。

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 14	a	J	解冻液 2#	图 3
应用实例 15	b	K	解冻液 1#	图 4
应用实例 16	b	L	解冻液 1#	图 5
对比实例 7	平衡液 1#	冷冻液 1#	解冻液 1#	图 2

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 17	a	J	解冻液 2#	图 8
应用实例 18	b	K	解冻液 1#	图 9

应用实例 19	b	L	解冻液 1#	图 10
对比实例 8	平衡液 1#	冷冻液 1#	解冻液 1#	图 7

根据图 1-5 可知，与使用不添加氨基酸类仿生控冰材料的对比实例 7 以及新鲜未冷冻的卵巢器官相比，实施例 14-16 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，实施例 14-16 组对于卵巢器官的冻存效果更好。

根据图 6-10 可知，实施例 17-19 的方案和对比实例 8 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。

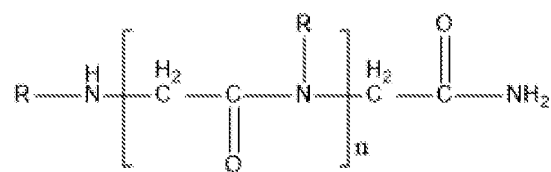
以上，对本发明的实施方式进行了说明。但是，本发明不限于上述实施方式。凡在本发明的精神和原则之内，所做的任何修改、等同替换、改进等，均应包含在本发明的保护范围之内。

权 利 要 求

1.一种无 DMSO 的冷冻保存液,其特征在于,以每 100 mL 体积计,含有仿生控冰材料 0.01-50g,多元醇 5.0-45mL,水溶性糖 0.1-1.0 mol L⁻¹,血清 0-30mL,余量为缓冲液,所述仿生控冰材料选自 PVA 和/或氨基酸类仿生控冰材料。

2.根据权利要求 1 所述的冷冻保存液,其特征在于,所述氨基酸类仿生控冰材料选自聚合度 ≥ 2 的聚氨基酸、氨基酸、肽类化合物中的一种或两种以上;

优选地,所述肽类化合物为多肽、糖肽衍生物、或式 (I) 所示化合物,



式 (I),

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。

3.根据权利要求 1 或 2 所述的冷冻保存液,所述控冰材料为 PVA,所述 PVA 含量为 0.1-6.0 g;

优选,所述多元醇可以为 C2-5 的多元醇,例如乙二醇,丙二醇,丙三醇中的任一种;

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、水溶性纤维素(例如羟丙基甲基纤维素)、海藻糖、聚蔗糖;

优选,所述缓冲液可以为 DPBS、hepes-buffered HTF 缓冲液、其他细胞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。

4. 根据权利要求 1-3 任一项所述的冷冻保存液,其特征在于,所述仿生控冰材料为聚氨基酸或氨基酸,所述控冰材料的含量为 0.01-50 g;

优选地,所述控冰材料为 PVA 与氨基酸和/或聚氨基酸的组合,例如由 0.1-5.0g 的 PVA 和 8.0-35g 的氨基酸和/或 1.0-9.0g 聚氨基酸组成。

5. 根据权利要求 1-4 任一项所述的冷冻保存液, 其特征在于, 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%-60%, 优选 50%-60%;

优选, PVA 选自分子量为 10-500kDa 或者更高分子量的 PVA;

优选, 所述 PVA 选自水解度为大于 80% 的 PVA;

优选, 所述聚氨基酸选自赖氨酸、精氨酸、脯氨酸、苏氨酸、组氨酸、谷酰胺酸、天冬氨酸、甘氨酸等中至少一种的均聚物 (聚合度 ≥ 2);

优选, 所述多肽选自 2-8 个不同的氨基酸组成的肽, 例如 2 肽、3 肽、4 肽, 例如 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) 中的一种或两种以上;

优选, 所述糖肽衍生物为糖类与氨基酸合成, 例如为葡萄糖内酯 (GDL) 与亲冰氨基酸通过化学键合而组成的分子, 例如: GDL-L-Thr, GDL-L-Gln, GDL-L-Asn, GDL-L-Phe, GDL-L-Tyr, GDL-L-Val, GDL-L-Ser 中的至少一种。

6. 根据权利要求 1-5 任一项所述的冷冻保存液, 其特征在于, 所述多元醇含量为 6.0-28 mL;

优选, 所述血清含量为 0。

优选, 所述水溶性糖含量为 0.1-1.0 mol L⁻¹;

优选, 所述冷冻保存液 pH 为 6.5-7.6。

7. 如权利要求 1-6 任一项所述的冷冻保存液的制备方法, 其特征在于, 包括如下步骤: 将控冰材料溶解于缓冲液中, 冷却到室温后调节 pH, 将其他组分溶解于剩下的缓冲液中, 冷却后混合;

优选, 包括如下步骤:

(1) 将 PVA 溶解于一部分缓冲液中, 冷却到室温后调节 pH, 得到溶液 1;

(2) 任选地, 将聚氨基酸或氨基酸溶解于一部分缓冲液, 冷却到室温后调节 pH, 形成溶液 2;

(3) 将水溶性糖溶解于一部分缓冲液中, 待水溶性糖全部溶解后加入除血清的其他组分, 制得溶液 3;

(4) 待溶液 1、任选地溶液 2、和溶液 3 冷却至室温后混合, 调节 pH 并采用缓冲液定容至预定体积, 得到所述冷冻保存液;

任选地, 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。

8.一种无 DMSO 的冷冻平衡液,其特征在于,以每 100 mL 计,含有 PVA 0-5.0 g,多元醇 5.0-45 mL,血清 0-30 mL,缓冲液余量;

优选地,所述 PVA 含量为 0.1-4.0 g。

9.根据权利要求 8 所述的冷冻平衡液,其特征在于,所述冷冻平衡液以每 100 mL 计,含有多元醇 7.5-15 mL,血清 10-20 mL,缓冲液 余量;

优选地,所述冷冻平衡液以每 100 mL 计,含有 PVA 0.5-3.5 g,多元醇 7.5-15mL,缓冲液 余量。

10.一种无 DMSO 的冷冻保存试剂,其特征在于,包括上权利要求 1-6 任一项所述冷冻保存液和权利要求 8-9 任一项所述的冷冻平衡液,所述冷冻保存液和冷冻平衡液独立存在。

优选地,血清含量为 0,所述冷冻平衡液以每 100 mL 计,含有 PVA 0.5-2.5g,多元醇 7.5-15mL,缓冲液 余量。

11.如权利要求 1-6 任一项所述的冷冻保存液和/或权利要求 8-9 任一项所述的冷冻平衡液在生物组织冷冻保存中的应用。

12.根据权利要求 11 所述的应用,所述生物组织选自卵母细胞、胚胎、干细胞、器官或组织中的至少一种。