(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 118202995 A
(43)申请公布日 2024.06.18

(21)申请号 202410259600.3

(22)申请日 2024.03.07

(71)申请人 上海理工大学
地址 200093 上海市杨浦区军工路516号

(72)发明人 左敬龙 韩恒鑫 胥义 臧传宝
刘志成 任季禹 郝焱

(74)专利代理机构 上海邦德专利代理事务所(普通合伙) 31312
专利代理师 梁剑

(51)Int.Cl.
*A01N 1/02*(2006.01)

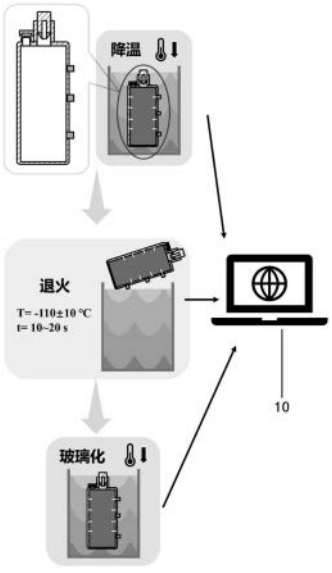
权利要求书2页 说明书6页 附图2页

(54)发明名称

一种用于大体积生物样本的新型等容玻璃化装置及方法

(57)摘要

本发明提供一种用于大体积生物样本的新型等容玻璃化装置及方法,属于生物样本保存技术领域,包括刚性腔体、样本保存室、温度检测装置和压力检测装置。刚性腔体外层为刚性壁面,内部壁面光滑并进行涂层处理,刚性腔体用于装载生物样本进辅助生物样本浸入液氮后快速玻璃化。在液氮中迅速降温时,新型等容玻璃化装置可保持样本保存室内生物样本的未冻结稳态,基于溶液在等容环境下热力学的限制来抑制冰生长。同时降温过程中包括降温、退火和在降温步骤,需转移时,将等容玻璃化装置防御便携液氮罐中进行转移和储藏。




CN 118202995 A

1.一种用于大体积生物样本的新型等容玻璃化装置,其特征在于,包括刚性腔体、样本保存室、温度检测装置、压力检测装置和实时信号温度-压力信号接收系统,所述样本保存室设于所述刚性腔体内部,并于刚性腔体的顶部设有样本加样口和溢流口并皆进行密封设置,所述样本加样口用于添加和存储大体积生物样本和低温保护剂;所述压力检测器设于刚性腔体顶部,所述温度检测器设于所述刚性腔体外周,两者皆与所述实时温度-压力信号接收系统信号连接,用于实时检测样本保存室内部温度和压力。

2.根据权利要求1所述的用于大体积生物样本的新型等容玻璃化装置,其特征在于,所述刚性腔体内壁涂有惰性涂层,用于减少所述样本保存室与其接触的表层上的冰晶成核位点。

3.根据权利要求1所述的用于大体积生物样本的新型等容玻璃化装置,其特征在于,当所述新型等容玻璃化装置浸入液氮中,因等容环境下热力学的限制,使得刚性密封满载的环境中抑制所述低温保存液成核结晶,从而使生物样本处于未冻结稳态,在未生成冰晶的前提下玻璃化。

4.根据权利要求1所述的用于大体积生物样本的新型等容玻璃化装置,其特征在于,所述密封设置具体为:所述样本加样口和溢流口皆设置有密封堵头,所述密封堵头皆配备有密封圈,所述压力检测器设固定于位于所述样本加样口位置处的所述密封堵头的顶部,用于验证低温保存液的玻璃化和判断反玻璃化;

所述样本保存室装载生物样本和低温保存液时,通过速率为10ml/min的速率进行灌注,从而实现刚性腔体内部无残留空气,随后使用密封堵头进行密封。

5.根据权利要求1所述的用于大体积生物样本的新型等容玻璃化装置,其特征在于,所述温度检测器的数量设置为多个,多个温度监测器由上到下等间距固定在刚性腔体的外壁,等间距设置的多个所述温度检测器用于检测降温过程的温度变化,并辅助降温过程中的退火操作。

6.根据权利要求4所述的用于大体积生物样本的新型等容玻璃化装置,其特征在于,两个所述密封堵头皆设有用于将多余低温保存液排出的排水凸起。

7.根据权利要求1所述的用于大体积生物样本的新型等容玻璃化装置,其特征在于,所述大体积生物样本包括小体积生物样本的高通量保存和单一大体积生物样本;所述低温保存液为针对不同大体积生物样本进行调配的添加有单种或多种低温保护剂的溶液。

8.一种针对大生物样本的转运及储藏方法,采用如权利要求1-7任意一项权利要求所述的用于大体积生物样本的新型等容玻璃化装置,其特征在于,包括以下步骤:

S1:将大生物样本与低温保存液混合并充分加载,将加载后的混合溶液加入样本保存室中,并进行封存;

S2:对装载有大生物样本的等容玻璃化装置依次进行降温、退火和在降温程序;

S3:当需要对装载有大生物样本的等容玻璃化装置进行转移时,将该等容玻璃化装置转移至便携液氮罐中进行转移和储藏;

S4:复温时,对等容玻璃化装置进行37℃水浴复温,当温度上升至设定温度后,取出样本,进行后续洗脱操作,完成对大生物样本的转运及储藏。

9.根据权利要求8所述的针对大生物样本的转运及储藏方法,其特征在于,所述S1和S2中,采用低速率低温保存液,所述低速率具体低温保存液时不混有气泡,并在降温和复温过

程中要求无外界干扰妨碍,以此避免降温过程中内部溶液发生扰动,导致冰核生长使得玻璃化失败。

10.根据权利要求5和8所述的针对大生物样本的转运及储藏方法,其特征在于,所述S3具体为:装载有样本的等容玻璃化装置转移至液氮罐中进行降温,降温至低温保护液的玻璃化转变温度前将等容玻璃化装置从液氮中提出,使其距离液氮表面3cm,进行退火,其中液氮退火温度为-110±10℃,退火时间为10s至20s,当退火完毕后,将等容玻璃化装置重新浸入液氮中,继续降温至设定温度。

# 一种用于大体积生物样本的新型等容玻璃化装置及方法

## 技术领域

[0001] 本发明属于生物样本保存技术领域,尤其涉及一种用于大体积生物样本的新型等容玻璃化装置及方法。

## 背景技术

[0002] 玻璃化可避免冰结晶来防止生物样本在低温保存过程中遭受冰晶生长带来的机械损伤,主要用于生物样本的长期低温保存。当前主流的玻璃化方法是使用高浓度的低温保护剂(CPA)来避免冰核的形成。而高浓度的CPA通常伴随更高的生物毒性,在生物样本加载/卸载CPA期间对生物样本造成很强的毒害作用。为此,解决办法主要通过减少样本体积和提高冷却速率来提高传热效率,例如使用毛细吸管和液滴来最小化待玻璃化样本的体积。而对于大体积的样本而言,增加玻璃化时的压力是另外一种方式,其可以降低玻璃化所需的CPA浓度。而冰I的密度低于水,在等容腔体中形成冰核会导致压力增加,使得冰核形成更加困难,因此根据热力学原理等容系统中的样本在玻璃化快速降温的过程中更难以出现冰核,从而避免降温过程和复温过程中的冰晶损伤。。

[0003] 因此,需要一种等容容器以及使用等容容器在低摩尔浓度的玻璃化溶液中对大体积样本以低冷却和升温速率促进玻璃化进程的方法。

## 发明内容

[0004] 本发明的目的在于提供一种用于大体积生物样本的新型等容玻璃化装置,这种装置要解决为现有玻璃化低温保存过程中,高浓度低温保护剂的毒性对于大体积样本的损伤和较高的降温速率以及复温速率要求。

[0005] 玻璃化态是由于高粘度液体在快速降温过程中形成类似玻璃态的状态,其是目前降低生物组织低温保存过程中冰晶损伤最有效的方法。但要实现玻璃化,往往需要添加实现玻璃化的低温保护剂,也能降低临界降温速率。小生物样本例如人类精子,在极高冷却速率下不添加玻璃化低温保护剂实现玻璃化保存,但是对于较大的生物组织,组织中心无法达到极高的冷却速率,则必须要添加低温保护剂。生物样本体积越大,实现玻璃化保存的挑战越大,则需要添加更高浓度的低温保护剂。然而,高浓度的低温保护剂往往增加了毒性的风险。同时低温保护剂还会影响临界复温速率,从而影响生物组织在复温过程中是否反玻璃化。因此,要实现大体积生物样本玻璃化保存,需要降低临界复温速率的同时有较低的毒性。

[0006] 等容玻璃化保存本质上是一个热力学平衡过程。在刚性的等容密封系统中,由于冰晶生长体积受限,且水溶液居具有难以压缩的性质,使得冰I型难以形成,在这过程中样本所在区域始终处于未冻结状态,其所处区域冰晶生长被抑制,从而保证其在高速降温过程中抑制冰晶生成从而顺利进入玻璃化状态。据现有研究表明,夏威夷珊瑚使用这一等容玻璃化原理可成功实现玻璃化保存,并在降温和复温过程中降低了对降温速率和复温速率的要求。

[0007] 本发明的技术方案如下：

[0008] 一种用于大体积生物样本的新型等容玻璃化装置，包括刚性腔体、样本保存室、温度检测装置、压力检测装置和实时信号温度-压力信号接收系统，样本保存室设于刚性腔体内部，并于刚性腔体的顶部设有样本加样口和溢流口并皆进行密封设置，样本加样口用于添加和存储大体积生物样本和低温保护剂；压力检测器设于刚性腔体顶部，温度检测器设于刚性腔体外周，两者皆与实时温度-压力信号接收系统信号连接，用于实时检测样本保存室内部温度和压力。

[0009] 进一步地，刚性腔体内壁涂有惰性涂层，用于减少样本保存室与其接触的表层上的冰晶成核位点。

[0010] 进一步地，当等容玻璃化装置浸入液氮中，因等容环境下热力学的限制，使得刚性密封满载的环境中抑制低温保存液成核结晶，从而使生物样本处于未冻结稳态，在未生成冰晶的前提下玻璃化。

[0011] 进一步地，密封设置具体为：样本加样口和溢流口皆设置有密封堵头，密封堵头皆配备有密封圈，压力检测器设固定于位于样本加样口位置处的密封堵头的顶部，用于验证低温保存液的玻璃化和判断反玻璃化；

[0012] 样本保存室装载生物样本和低温保存液时，通过速率为10ml/min的速率进行灌注，从而实现刚性腔体内部无残留空气，随后使用密封堵头进行密封。

[0013] 进一步地，温度检测器的数量设置为多个，多个温度监测器由上到下等间距固定在刚性腔体的外壁，等间距设置的多个温度检测器用于检测降温过程的温度变化，并辅助降温过程中的退火操作。

[0014] 进一步地，两个密封堵头皆设有用于将多余低温保存液排出的排水凸起。

[0015] 进一步地，大体积生物样本包括小体积生物样本的高通量保存和单一大体积生物样本；低温保存液为针对不同大体积生物样本进行调配的添加有单种或多种低温保护剂的溶液。

[0016] 一种针对大生物样本的转运及储藏方法，采用用于大体积生物样本的新型等容玻璃化装置，包括以下步骤：

[0017] S1：将大生物样本与低温保存液混合并充分加载，将加载后的混合溶液加入样本保存室中，并进行封存；

[0018] S2：对装载有大生物样本的等容玻璃化装置依次进行降温、退火和在降温程序；

[0019] S3：当需要对装载有大生物样本的等容玻璃化装置进行转移时，将该等容玻璃化装置转移至便携液氮罐中进行转移和储藏；

[0020] S4：复温时，对等容玻璃化装置进行37℃水浴复温，当温度上升至设定温度后，取出样本，进行后续洗脱操作，完成对大生物样本的转运及储藏。

[0021] 进一步地，S1和S2中，采用低速率低温保存液，低速率具体低温保存液时不混有气泡，并在降温和复温过程中要求无外界干扰妨碍，以此避免降温过程中内部溶液发生扰动，导致冰核生长使得玻璃化失败。

[0022] 进一步地，S3具体为：装载有样本的等容玻璃化装置转移至液氮罐中进行降温，降温至低温保护液的玻璃化转变温度前将等容玻璃化装置从液氮中提出，使其距离液氮表面3cm，进行退火，其中液氮退火温度为-110±10℃，退火时间为10s至20s，当退火完毕后，将

等容玻璃化装置重新浸入液氮中,继续降温至设定温度。

[0023] 与现有技术相比,本发明的有益效果主要体现在:

[0024] 1、基于冰晶形成的热力学与动力学原理,等容玻璃化使得腔室内部的冰核难以形成,从而保证中心区域的生物样品可以安全度过冰成核危险区,从而实现玻璃化。

[0025] 2、本发明的惰性涂层均采用生物相容性好,无毒无害材质,可以进一步减少冰成核位点,提高生物样本的玻璃化成功率,且其具备疏水性,不与样本溶液体系粘合,保证样本的装载和卸载期间无残留损耗。

[0026] 3、本发明中样本保存室内部可以进行额外的表明改性,通过减少低温保护剂溶液的冰晶成核点位来进一步降低玻璃化降温过程中的冻结概率。

[0027] 4、根据等容状态下生物样本玻璃化所需的低浓度低温保护剂和较低的临界降温和复温速率的原理,可以实现大体积生物样本的玻璃化保存。

[0028] 5、本发明中为提高样本保存室内部溶液体系的玻璃化成功率,针对容器整体进行退火操作,可以实现样本所在区域在降温过程中产生更小的热应力。

[0029] 6、本发明装置简单,无需额外复杂的玻璃化保存设备,仅通过等容容器自身即可维持降温过程中的未冻结稳态,极大提高中心样本保存室的玻璃化概率,为大体积生物样本玻璃化长期保存提供便利。

## 附图说明

[0030] 图1为本发明一种用于大体积生物样本的新型等容玻璃化装置的玻璃化保存示意图;

[0031] 图2为本发明一种用于大体积生物样本的新型等容玻璃化装置中样本存储罐工作前的结构示意图;

[0032] 其中,1、刚性腔体;2、样本加样口;3、溢流口;4、样本加样口密封堵头;5、溢流口密封堵头;6、惰性涂层;7、样本保存室;8、温度检测器;9、压力检测器;10、实时温度-压力信号接收系统。

## 具体实施方式

[0033] 下面将结合示意图对本发明一种用于大体积生物样本的新型等容玻璃化装置进行更详细的描述,其中表示了本发明的优选实施例,应该理解本领域技术人员可以修改在此描述的本发明,而仍然实现本发明的有利效果,因此,下列描述应当被理解为对于本领域技术人员的广泛知道,而并不作为对本发明的限制。

[0034] 工作原理

[0035] 将等容容器浸入液氮浴中(直至容器与压力传感器的连接处,压力传感器本身严格绝缘,以使其始终保持在-50℃以上),使其达到稳定状态。温度和压力全程监测,压力的迅速增加表明系统中冰的增长,即可直接证明为玻璃化失败。这种简单的骤降法为容器与外界环境提供了最大的温差,为此带来的最大的降温速率。因此,样本保存室内的低温保存液在这些条件下成功地玻璃化。对于不同的生物样本,所需的降温速率也不尽相同,对于较慢的冷却可以通过将不同程度的绝热层包裹在容器的刚性腔体外层,从而降低冷却速率。在复温时将容器从液氮中取出,并放置于37℃水浴中进行复温。当复温过程时,与降温过程

中相符的是,等容密封的刚性腔体仍具备抑制冰晶生长的能力,在此环境下样本保存室内的溶液难以形成冰I。

[0036] 除此之外,样本保存室4在快速冷却过程中,中心冷却速率慢,其内外温差大而产生的应力,可能导致样本结构损伤。为解决这一问题在降温过程中,可以通过“退火”操作平衡降温时溶液体系内外温度梯度,释放热应力,从而改善玻璃化保存效果,操作流程如图1所示。当温度检测器5所示温度到达-110±10℃时,将等容玻璃化容器从液氮中取出,将其停留在液氮表面上3cm处高度,恒定10s至20s,使其样本保存室中心与外壁的温度差减小,降低样本保存液(即低温保护剂)的热应力,从而避免大体积生物样本在降温的过程中造成损伤。其中要注意的是,不同体积的样本保存室和不同的低温保护剂对应的退火温度和退火时间均有所不同,例如血管对应的退火温度为-110℃,退火时间为10s,需根据不同的生物样本保存情况制定不同的退火方案,以选择最佳的退火方案。

[0037] 等容系统对样本保存室内低温保护液玻璃化过程中的冰晶生长存在抑制作用,其分析如下:

[0038] 冰的形成是一个概率事件。为了发生冻结,水分子必须通过随机运动组装成大于临界尺寸的冰状结构。这个临界尺寸对应于一个能量屏障:一旦越过这个势垒,它就会在能量上有利于更多的水分子加入冰结构,导致冰的自发传播。对于形成的冰晶而言,其半径r和体积$\frac{4}{3}\pi r^3$在等容系统中与冰晶在体积V、压力P和温度T的等压系统中的自由能变化不同。冰的比容与水有很大不同,因此,在等压系统中形成冰晶会导致系统体积增加,而在等容系统中,则会导致系统压力增加。因此可得以下假设:(1)在冰核存在的情况下,系统中液体的体积基本上等于系统的总体积(即质量为<<1),(2)冰和冰的热力学性质在冰晶形成前后保持不变。

[0039] 在同压系统的情况下,冰晶形成时自由能的变化是三个分量所引起的:冰晶中分子的冰态和液态之间的吉布斯自由能的变化,冰和液体之间界面形成相关的能量,以及系统体积随压力P的增加。公式如下:

[0040] $$\Delta G = \frac{4\pi r^3}{3\nu_i}(g_i - g_l) + 4\pi r^2\sigma + \frac{4\pi r^3}{3\nu_i}(\nu_i - \nu_l)P$$

[0041] 其中$g_i$和$g_l$是每单位质量的冰和液体的比吉布斯自由能,$\nu_i$和$\nu_l$是冰和液态水的特定体积,σ是冰和液态之间的表面张力。

[0042] 在等容系统的情况下,冰晶形成时自由能的变化是三个分量所引起的:冰晶中分子的冰态和液态之间的亥姆霍兹自由能的变化,与冰和液体之间界面形成相关的能量,以及与体积V一同增长的压力的相关的能量。公式如下:

[0043] $$\Delta F = \frac{4\pi r^3}{3\nu_i}(f_i - f_l) + 4\pi r^2\sigma + V\Delta P$$

[0044] 其中$f_i$和$f_l$是每单位质量的冰和液体的特定亥姆霍兹自由能。

[0045] 在经典成核分析中,吉布斯自由能变化方程中的第三项相对于其他两项可以忽略不计。相而亥姆霍兹自由能方程中的第三项相对于其他两项不可忽略不计。其中第三项的公式如下:

[0046] $$V\Delta P = V\frac{x}{k} = V\frac{m_{\mathrm{i}}}{m_{\mathrm{l}}}\frac{1}{k} = \frac{V_{\mathrm{i}}}{\nu_{\mathrm{i}}}\frac{\nu_{\mathrm{l}}}{k} = \frac{4\pi r^3}{3\nu_{\mathrm{i}}}\frac{\nu_{\mathrm{l}}}{k}$$

[0047] 其中k为等容室内的压力与冰I比例的变化斜率。

[0048] 而等压系统内相变时自由能的变化只是温度的函数,即:

[0049] $$g_{\mathrm{i}} - g_{\mathrm{l}} = f_{\mathrm{i}} - f_{\mathrm{l}} = \frac{-L(T)}{T}(T_{\mathrm{m}} - T)$$

[0050] 其中L是每单位质量的聚变潜热,$T_m$是给定压力下的熔化温度。

[0051] 从而推算处冰传播的临界尺寸对应于ΔG(在等压条件下)或ΔF(在等容条件下)的最大值。临界聚类半径rcritical,是通过对r的ΔG和ΔF方程进行微分并将结果设置为零而获得的。结果如下:

[0052] 等压系统: $$r_{\text{critical isobaric}} = \frac{-2\sigma\nu_{\mathrm{i}}}{\frac{-L(T)}{T}(T_{\mathrm{m}}-T)+(\nu_{\mathrm{i}}-\nu_{\mathrm{l}})P}$$

[0053] 等容系统: $$r_{\text{critical isochoric}} = \frac{-2\sigma\nu_{\mathrm{i}}}{\frac{-L(T)}{T}(T_{\mathrm{m}}-T)+\frac{\nu_{\mathrm{l}}}{k}}$$

[0054] 所以,在等压系统中,临界半径在T=0℃时是渐近的,因为在该温度下均匀成核需要无限大的冰团。随着T的减少,冰的形成变得更加有利,因此,在较低的温度下需要更小的临界团簇。

[0055] 在等容系统中,临界半径在T=-109℃时是渐近的。在T<-109℃之前,不存在临界半径的有限正值。在低于-109℃的温度下,等压系统的行为方式与等压系统相似。因此,从理论上讲,对于理想系统,在系统过冷到-109℃以下之前,在等容条件下不可能实现均匀成核。因此,等容条件十分有利于促进玻璃化的进行,使得样本保存室内的生物样本在玻璃化过程中避免了冰晶均匀成核的可能性,从而保证玻璃化的成功率。

[0056] 实施例1

[0057] 参考图2,一种用于大体积生物样本的新型等容玻璃化装置,包括刚性腔体1、样本保存室7、温度检测器8和压力检测器9,样本保存室7设置在刚性腔体1内,刚性腔体1采用耐高压耐低温的特种合金制成,对其要求为高强度、低形变,以实现在液氮温度下具备300MPa以上的抗压能力,用于将压力约束至内部,如7075铝合金或奥式不锈钢。样本保存室7为生物样本和低温保护剂的溶液系统装载区域。

[0058] 刚性腔体1外周,样本保存室7于刚性腔体1的顶部设有样本加样口2,在刚性腔体1的颈部设有溢流口3,并分别采用样本加样口密封堵头4和溢流口密封堵头5进行密封,而两个密封堵头都通过密封圈实现密封设置,样本加样口2用于添加和存储大体积生物样本和低温保护剂,压力检测器9在样本加样口密封堵头4顶部固定,用于验证低温保存液的玻璃化和判断反玻璃化。刚性腔体1设有样本加样口密封堵头4的作用一方面是密封,另一方面可以隔绝压力检测装置对于样本保存室7内部冰晶成核的影响。溢流口3用于排出多余样本保存也以及排出空气,同样设置有密封堵头,即溢流口密封堵头5。样本加样口密封堵头4和溢流口密封堵头5用于完全密封刚性腔体1,并保持腔体内部完全注满无任何气体残留。

[0059] 刚性腔体1内壁涂有惰性涂层6,用于增加内壁表面光滑程度,减少冰成核位点,同时惰性涂层6可以具备疏水型,可以辅助生物样本溶液体系的装载和卸载,减少样本残留损

耗,例如BiofloatFlex涂层。

[0060] 刚性腔体1的外周设置有多个温度检测器8,温度检测器8的数量根据需求确定,本发明设置有三个,通竖直方向由上到下等间距设置在刚性腔体1的外周。

[0061] 如图1所示,三个温度检测器8和压力检测器9与实时温度-压力信号接收系统10信号相接,使得在降温过程中可以实时检测温度和压力变化,用于判断玻璃化是否成功。当压力出现增长时,并伴随有温度上升,即出现冰晶成核的现象,说明玻璃化失败,反之则更有利于玻璃化成功。

[0062] 刚性腔体1和密封堵头要求为不同类型的金属材质,与样本加样口密封堵头4相比,要求刚性腔体1在低温下具有更低的热膨胀温度系数,使得其在降温过程中产生的热胀冷缩更有利于与样本加样口2啮合,强化腔体的密封效果。

[0063] 样本加样口密封堵头4和溢流口密封堵头5底部与低温保存液相接触区域,均涂有该惰性涂层6,并在每次实验后重新加载惰性涂层6,用于进一步减少冰晶成核的位点。

[0064] 本发明中,大体积生物样本包括小体积生物样本的高通量保存如细胞,以及单一大体积生物样本如组织和器官。低温保存液为针对不同大体积生物样本进行调配的添加有单种或多种低温保护剂的溶液。低温保存液的成分包括且不限于:甲酰胺、二甲亚砜(DMSO)、丙二醇、甘油、乙二醇、海藻糖、蔗糖、多元醇、葡萄糖或前述的任意组合。

[0065] 实施例2

[0066] 本发明还公开一种针对大生物样本的转运及储藏方法,采用等容玻璃化装置,包括以下步骤:

[0067] S1:将大生物样本进行提取,并选择适配的低温保存液;

[0068] S2:将大生物样本与低温保存液混合并充分加载,将加载后的混合溶液加入样本保存室7中,并进行封存;

[0069] S3:对装载有大生物样本的等容玻璃化装置依次进行降温、退火和在降温程序;

[0070] S4:当需要对装载有大生物样本的等容玻璃化装置进行转移时,将该等容玻璃化装置转移至便携液氮罐中进行转移和储藏;

[0071] S5:复温时,对等容玻璃化装置进行37℃水浴复温,当温度上升至设定温度后,取出样本,进行后续洗脱操作,完成对大生物样本的转运及储藏。

[0072] S1和S2中,采用低速率加入低温保存液,低速率通常为10ml/min,不同的保存液灌注速率略有不同。低速率灌注的目的是灌注低温保存液时不混有气泡,灌注完毕后轻微震荡,观察是否溶液底部混有气泡。

[0073] S3具体为:装载有样本的等容玻璃化装置转移至液氮罐中进行降温,降温至低温保护液的玻璃化转变温度前将等容玻璃化装置从液氮中提出,使其距离液氮表面3cm,进行退火,其中液氮退火温度为-110±10℃,退火时间为10s至20s,当退火完毕后,将等容玻璃化装置重新浸入液氮中,继续降温至设定温度。

[0074] 上述仅为本发明的优选实施例而已,并不对本发明起到任何限制作用。任何所属技术领域的技术人员,在不脱离本发明的技术方案的范围内,对本发明揭露的技术方案和技术内容做任何形式的等同替换或修改等变动,均属未脱离本发明的技术方案的内容,仍属于本发明的保护范围之内。

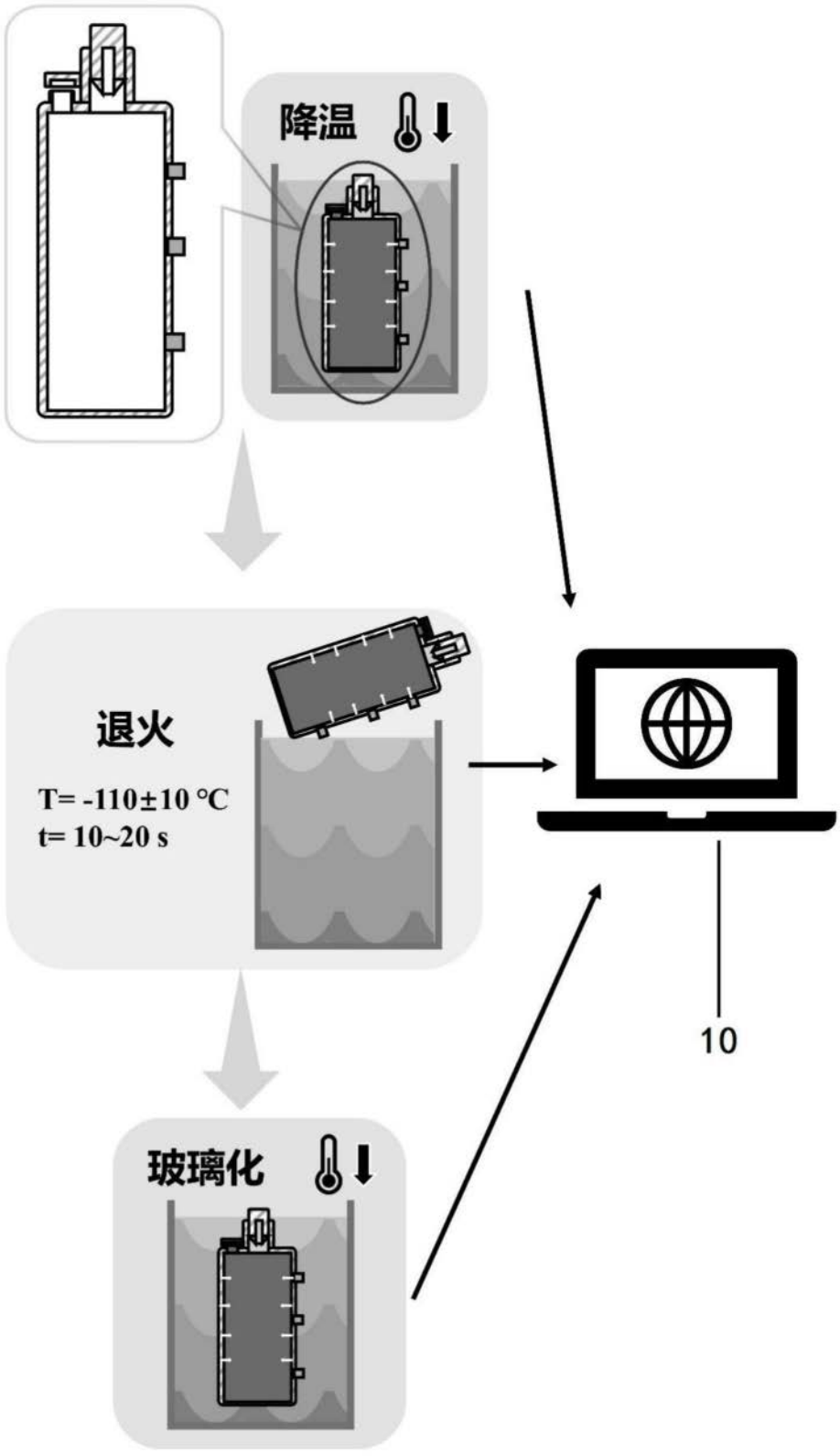



图1

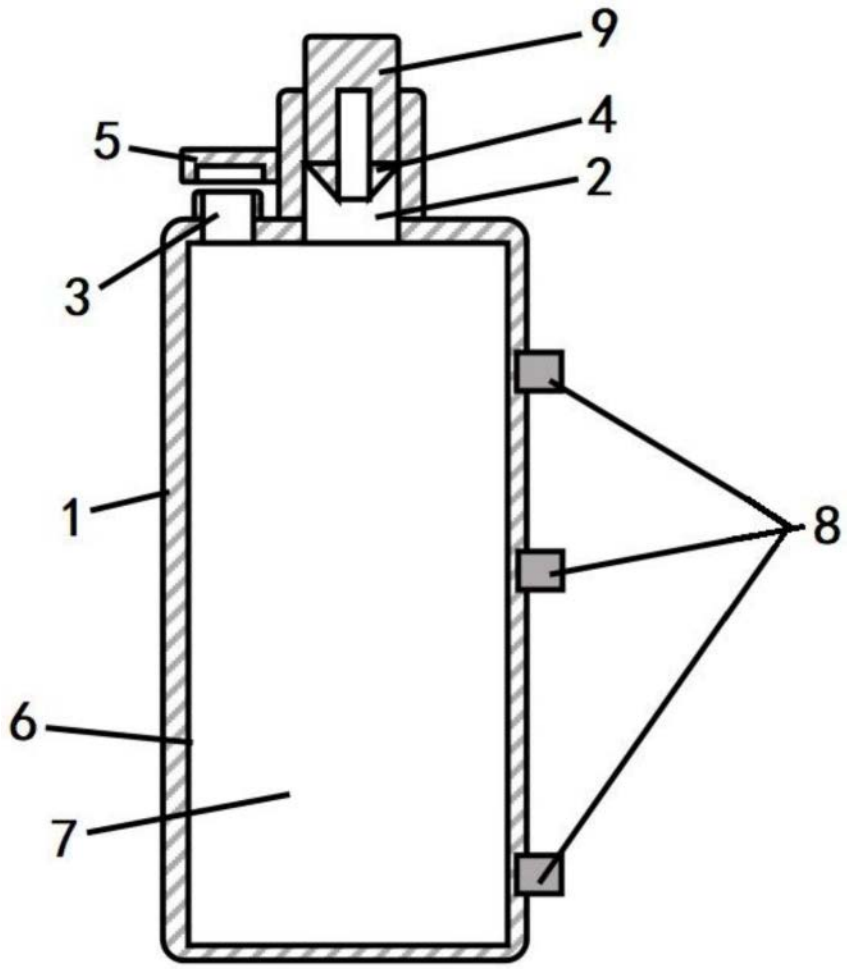



图2