

文章编号:0253-4339(2013) 05-0095-04
doi:10. 3969/j. issn. 0253-4339. 2013. 05. 095

冷冻载体 Cryotop 降温速率的测量及系统优化

李维杰¹ 周新丽¹ 戴建军² 张德福² 刘宝林¹ 王海松¹

(1 上海理工大学生物热科学研究所 上海 200093;
2 上海农业科学院畜牧兽医研究所 上海农业遗传育种重点实验室动物遗传工程研究室 上海 201106)

摘 要 Cryotop 法是玻璃化保存卵母细胞较有效的方法之一。当 Cryotop 载体插入液氮时,降温速度极高,几乎瞬间完成,常规的方法无法测量。实验使用数字示波器、线径 25μm 的 T 型热电偶建立起高速测温系统,测量了 Cryotop 法用于卵母细胞低温保存时的降温速率。通过改变载体材料、厚度、冷源温度等条件,提高 Cryotop 的降温速率。结果发现当使用 60μm 的铜质载板,使用浆状液氮作为冷源时,降温速度最高,可达到(37130 ± 1336) K/min,较商品化的 Cryotop 的降温速度((11982 ± 1936) K/min)提高了 2 倍。

关键词 Cryotop; 降温速率; 高速测温

中图分类号:TB61⁺1 **文献标识码**:A

Cooling Rate Measurement and System Optimization for Cryotop Device

Li Weijie¹ Zhou Xinli¹ Dai Jianjun² Zhang Defu² Liu Baolin¹ Wang Haisong¹

(1. Institute of Biothermal Technology, University of Shanghai for Science and Technology, Shanghai, 200093, China;
2. Animal and Veterinary Research Institute, SAAS, Shanghai Municipal Key Laboratory of Agri-Genetics and Breeding, Shanghai, 201106, China)

Abstract Cryotop is one of the best effective methods for oocytes cryopreservation. When Cryotop is inserted into liquid nitrogen, the cooling speed is extremely high, which is difficult to measure by conventional method. In this study, digital oscilloscopes and type T thermocouple of 25μm diameter were employed to establish a high speed temperature measurement system. The cooling rates of Cryotop device at different carrier material, thickness and cold source temperature were measured. The results showed that when 60μm copper was used as carrier and slush nitrogen was used as cold source, the cooling rate was increased. It could reach (37130 ± 1336) K/min, which was twice higher than that of commercially available Cryotop ((11982 ± 1936) K/min).

Keywords Cryotop; cooling rate; ultra-fast temperature measurement

卵母细胞的低温保存技术是人类辅助生殖领域和保护优质家畜种质资源的重要手段。目前,研究者们已设计了多种冷冻方法来实现卵母细胞的玻璃化冷冻, Cryotop 法是近期根据最小体积法提出的卵母细胞玻璃化冷冻方法^[1]。此方法将细胞溶液加载到塑料长条载板上,用吸管移除绝大部分的细胞外冷冻保护液,然后投入液氮进行冷冻。其特点是使用的冷冻保护液很少,细胞与液氮的直接接触面积大,细胞与冷源间的整体热阻很小,降温速率很高。

在实际应用中, Cryotop 降温速度的测量很困难。一是由于降温速率极快(10⁵ K/min)^[2],二是由于液滴体积小,热电偶的探头会干扰极小液滴的温度分布。这就使得采用不同冷冻载体对卵母细胞进行玻璃化保存时,难以比较各自冷冻性能的优劣,要么采用数值模拟的方法估计降温速率^[3,4],要么只能通过玻璃化保存后的存活率和发育潜能来判断,费时费力。此外, Cryotop 系统尽管在卵母细胞的低温保存中效果较好,但是利用该方法保存的卵母细胞,冷冻存活率仅维持在 70% 左右,而发育潜能更低。载板材料的传热性能、载板厚度、冷源温度等都仍有优化的空间,而冷冻载体的优化设计需要通过冷却速率的测量来验证。因此,选择一个可行的方案来获取 Cryotop 在冷冻过程中的降温速率是十分必要的。

常用的温度测量系统的普遍特点为:数据采集设备的数据采集频率低(<1MS/s),热电偶的响应速度慢,热电偶的直径较大(>80μm)等。将要测量的样

品体积很小,测量的时间短,因此需要数据采集设备有较高的采样频率以满足实验数据在数量上的要求,同时热电偶的线径必须尽可能的小于样品的体积,热电偶的响应时间也必须足够快。但能达到这一要求的常规的数据采集设备却十分昂贵。因此,搭建一套采样频率高、便宜简单的快速测温系统是十分有意义的。

利用直径 25 μm 的 T 型热电偶和带 USB 的数字示波器组建高速测温系统,分别测量了商品化 Cryotop 和自制铜片 Cryotop,不同厚度的铜片 Cryotop 在液氮和浆态氮中的降温速率,分析不同的 Cryotop 材料、厚度,以及不同的冷源温度对 Cryotop 降温速率的影响,为优化 Cryotop 的结构,提高其玻璃化效果提供依据。

1 材料与方法

1.1 快速测温装置建立

快速测温系统主要由热电偶、带 USB 端口的数字示波器和计算机组成。根据 F. W. Kleinhans 等^[5]的分析,热电偶采用灵敏度高、单根线径 25 μm 的 T 型热电偶(Omega[®], 美国)。同时,采集热电偶电压信号的仪器也要具有足够高的采集频率,能够在样品冷冻过程中采集到足够多的数据。采用带 USB 端口的数字示波器(型号 DS1062CD RIGOL[®], 中国)作为信号采集设备,最大实时采样频率为 400MSa/s。数字示波器采集热电偶在测温过程中反馈的直流电压信号并进行保存,然后通过 USB 端口将数据传入计算机,利用 MS Excel 进行处理和分析。快速测温装置如图 1 所示。

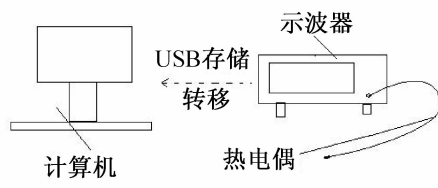


图 1 快速测温装置图

Fig. 1 The ultra-fast temperature measurement system

实验中采用的直径 25 μm 的 T 型热电偶为无外皮的裸丝,极易折断,所以操作时要格外小心。购买的热电偶都固定在塑料片上,该塑料片可以直接作为操作杆,用镊子小心将热电偶的尖端挑起来,剪掉多余长度的载板,用胶带将 Cryotop 载片固定在操作杆上,铜片与热电偶尖端靠近,但不接触。用胶带将 T 型热电偶接线柱固定于操作杆另一端,接通热电偶两根导线,接线柱的插孔插延长线并接示波器。在热电

偶与 Cryotop 载板接触的部位滴加 0.5 μL 的冷冻保护液滴,加载过程如图 2,加载后的显微照片如图 3。冷冻过程是将装载有液滴、测温设备的 Cryotop 装置从室温迅速插入冷源(液氮: -196 $^{\circ}\text{C}$ 或 浆态氮: -207 $^{\circ}\text{C}$) 中。

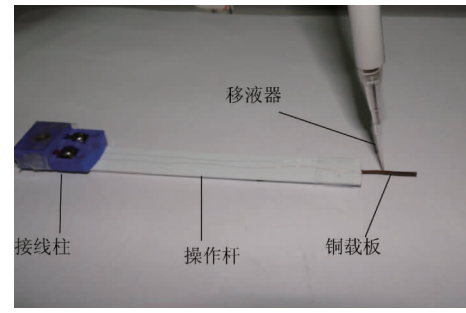


图 2 加载液滴的过程

Fig. 2 The process of loading the droplet

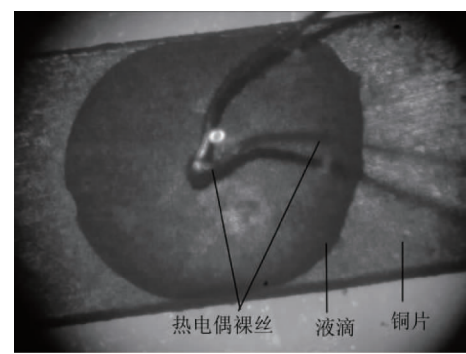


图 3 加载液滴后的显微照片

Fig. 3 The microscope picture of droplet with thermocouple

1.2 拟合电压温度曲线及其公式

根据 Omega 公司提供的 T 型热电偶分度表^[6],选取其中 -200 $^{\circ}\text{C}$ 到 40 $^{\circ}\text{C}$ 区间作为数据区,使用 matlab 拟合该区间内电压和温度的关系曲线,建立 4 次多项式:

$$T = -0.0464V^4 - 0.1111V^3 - 0.8303V^2 + 26.2278V + 0.1218 \quad (1)$$

式中: T 为温度值, $^{\circ}\text{C}$, V 为热电偶两端的电压, mV 。

由于 Omega 公司提供的 T 型热电偶分度表是在 0 $^{\circ}\text{C}$ 测得,我们实际测量中未使用参比,根据热电偶测温原理^[7],我们可以使用数学方法进行适当的校正。将热电偶裸丝插入液氮中,使用示波器记录热电偶的电压变化 1min。理论上液氮的温度为 -196 $^{\circ}\text{C}$,热电偶插入液氮后 1min 后的温度应该保持在液氮温度下,1min 内电压的平均值为 -6.72mv,根据分度表 -196 $^{\circ}\text{C}$ 时,电压值为 -5.54mv,因此实际测得的电压值应该增加一个矫正值 $\Delta V = -5.54\text{mv} -$

(-6.76mv) = 1.22mv。热电偶的真实值为：

$$V = V' + \Delta V \tag{2}$$

式中： V' 为测量值； ΔV 为修正值。

1.3 降温速率的读取

将热电偶测得的电压值换算为真实值，直接代入拟合的公式中，通过 Excel 绘制时间和温度散点图，必要时使用程序滤去噪音。图 4 为绘制的降温曲线，将降温部分拟合一条直线，求其斜率即为降温速率，单位为 K/s，后文为了便于比较统一换算为 K/min。

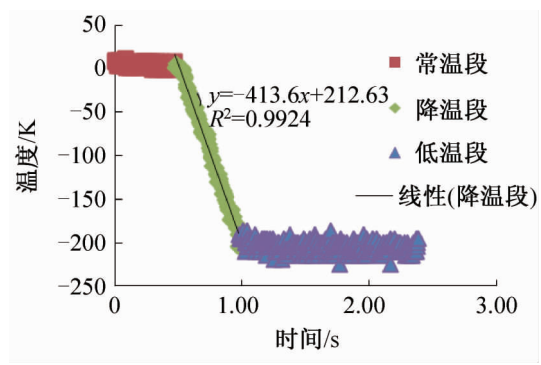


图 4 温度时间曲线图
Fig. 4 Temperature vs. time. curve

2 结果与讨论

2.1 商品化 Cryotop 载板降温速度同自制 Cryotop 降温速率比较

分别测量 100 μ m 商品化 Cryotop 载板（聚氯乙烯）和 100 μ m 铜片载板插入液氮时的降温速率。实验发现，采用商品化的 Cryotop 冷冻时，降温速度为 11982 $\pm$ 1936 K/min，而采用相同厚度的铜片作为载片，其降温速度可达到 13308 $\pm$ 1954 K/min，显然采用铜作为载体材料可以显著提高冷冻过程的降温速率。提高降温速率的原因是铜的导热系数^[8] (387.6 W/(m·K)) 明显高于聚氯乙烯的导热系数^[9] (0.04 W/(m·K))。Cryotop 中液滴的降温过程包括热传导和对流换热，液滴与液氮直接接触的表面以对流换热为主，液滴与 Cryotop 载体接触的表面以热传导为主。根据热阻 $R = \delta / (A\lambda)$ ，其中 δ 为载板的厚度， A 为载板的表面积， λ 为铜的导热系数，铜载板和 PVC 载板相比，厚度和表面积完全一致，不同之处在于铜载板有更高的导热系数因此铜可以加快热传导。但是尽管铜的导热系数是 PVC 导热系数的近万倍，但是降温速率却没有极大提高，这是由于在降温过程中起主导作用的仍然是液滴与液氮之间的对流换热，液滴通过向铜导热散失的热量相对较小，对整个降温过程影响不大。在对流换热和热传导的共同作用下，同

样尺寸的铜制载板和 PVC 载板相比，使用铜的降温速率比使用聚氯乙烯载板有显著提高，但只是在同一数量级上增加。

2.2 不同厚度铜片降温速度的比较

分别测量 60 μ m, 100 μ m, 120 μ m, 150 μ m, 200 μ m 厚的铜质 Cryotop 载板插入液氮时的降温速率。不同载板厚度的降温速率如图 5 所示，比较测得的降温速率发现，铜载板的降温速率随着厚度增加而减少，60 μ m 时其降温速率最高，可达到 (15718 $\pm$ 1172) K/min，当厚度为 200 μ m，降温速率最慢，为 (8894 $\pm$ 1366) K/min。这是由于厚度反比于热阻 R ，因此，在实际的应用中，在材料强度允许的情况下，应尽量减少材料的厚度，以提高冷冻过程的降温速率，提高玻璃化效果。受材料强度的限制，不可能无限制地降低 Cryotop 载板的厚度，当载板厚度低于 60 μ m 时，Cryotop 载板易弯折，不能对细胞起到很好的支撑和保护作用。

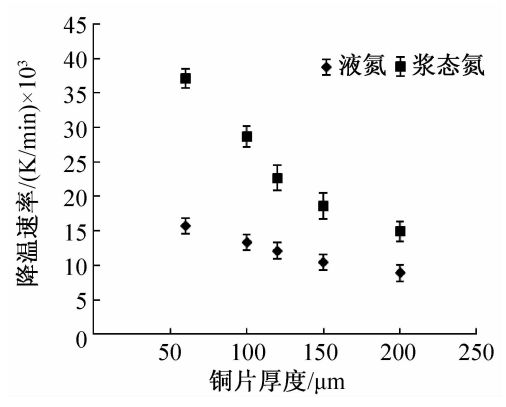


图 5 不同厚度的载板在不同冷源中降温时的降温速率比较
Fig. 5 The cooling rates of different carriers in different cold sources

2.3 不同冷源对铜片降温速率的影响

分别测量 60 μ m, 100 μ m, 120 μ m, 150 μ m, 200 μ m 厚的铜质 Cryotop 载板插入浆状液氮时的降温速率，浆状液氮由商品化的浆状液氮仪 (Type Vitmaster® 0200-1, 英国) 制得，图 5 同样反映了使用浆态液氮对降温速率的影响，对于相同厚度的铜片使用浆状液氮其降温速率有不同程度的提高，对于 60 μ m 的铜片，当使用浆状液氮时，其降温速率由 (15718 $\pm$ 1172) K/min 阶跃为 (37130 $\pm$ 1336) K/min，降温速率提高了一倍多，而对于 200 μ m 的铜片，使用浆状液氮时降温速率由 (8894 $\pm$ 1366) K/min 阶跃为 (14922 $\pm$ 1450) K/min，速度提高了近一倍。在标准大气压下，液氮的温度为 -196 $^{\circ}$ C，浆状液氮是指通过抽真空降低液氮表面蒸汽压，使其温度低于 -196 $^{\circ}$ C，形成的浆态液

氮^[10],我们测得的浆态氮温度为 -207°C 。根据热力学导热过程中热流量 $\phi = \Delta t/R$,得出降温速率正比于温差 Δt ,反比与热阻 R ,由于载板没有变化,所以热阻 R 不变,浆态氮温度比普通液氮温度低 11°C ,与降温物体的温差更大,有利于提高降温速率。同时,使用普通液氮作为冷源对物体降温时,由于吸收热量,自身气化,会在被降温物体表面形成一层氮气膜,由于该气膜的热阻较大,阻碍了物体与氮气之间的热量交换,当使用浆状液氮的时候,浆状液氮吸收热量转化为普通液氮,并不产生大量的气体,避免气膜热阻影响传热。因此,在使用浆状氮的时候,尽管冷源温度只降低了 11°C ,其降温速率却提高了1倍左右,与商品化的Cryotop比,改进后的铜质Cryotop降温速率提高了2倍。

2.4 误差分析

实验中为了减少误差,使用了相对较大的液滴 $0.5\mu\text{L}$,这样所测的商品Cryotop的降温速率远低于Kleinhans^[8]等人所测的 $96000\text{K}/\text{min}$,但降温速率随载板厚度、冷源温度、材质的变化趋势不受液滴大小的影响。Cryotop插入液氮的瞬间,插入角度,深度和速度对于实验结果有一定影响,如果能保证每次实验条件一致,测量结果将更有可比性。尽管实验中使用的热电偶体积非常小,但由于体积效应,仍然对液滴中的温度场有干扰,同时由于热电偶自身的热容量,会造成 0.002s 响应时间延后,也会略微影响最终结果的精确性。

3 展望

首创了铜载板的Cryotop,降温速率较塑料有所提高,但是生物样本在冷冻中存活率涉及生物相容性及毒性等多种复杂因素的影响,铜质Cryotop载板的冷冻效果还有待于生物实验进一步验证。

本文受上海市重点学科(S30503)项目资助。(The project was supported by Shanghai Leading Academic Discipline Project (No. S30503).)

参考文献

[1] Kuwayama M. Highly efficient vitrification for cryopreservation of human oocytes and embryos: The Cryotop method

[J]. Theriogenology, 2007, 67(1): 73-80.

[2] Cobo A, Domingo J, Perez S, et al. Vitrification: an effective new approach to oocyte banking and preserving fertility in cancer patients[J]. Clinical & Translational Oncology, 2008, 10(5): 268-273.

[3] Li W, Zhou X, Wang H, et al. Numerical analysis to determine the performance of different oocyte vitrification devices for cryopreservation[J]. Cryoletters, 2012, 33(2): 143-149.

[4] Sansinena M, Santos M V, Zaritzky N, et al. Numerical simulation of cooling rates in vitrification systems used for oocyte cryopreservation[J]. Cryobiology, 2011, 63(1): 32-37.

[5] Kleinhans F W, Shinsuke S, Peter Mazur. Simple, inexpensive attainment and measurement of very high cooling and warming rates[J]. Cryobiology, 2010, 61(2): 231-233.

[6] Omega Engineering Inc., Stamford, Connecticut, USA. mV vs. Temperature reference charts[EB/OL]. (2011-09-13)[2012-6-04]. <http://www.omega.com/temperature/Z/pdf/z207.pdf>.

[7] 游伯坤. 温度测量与仪表: 热电偶和热电阻[M]. 北京: 科学技术文献出版社, 1990.

[8] 韩占忠, 王敬, 兰小平. FLUENT: 流体工程仿真计算实例与应用[M]. 北京: 北京理工大学出版社, 2004.

[9] Wilkes C E, Summers J W, Daniels C A. 聚氯乙烯手册[M]. 北京: 化学工业出版社, 2008.

[10] Santos M V, Sansinena M, Zaritzky N, et al. Assessment of external heat transfer coefficient during oocyte vitrification in liquid and slush nitrogen using numerical simulations to determine cooling rates[J]. Cryoletters, 2011, 33(1): 31-34.

作者简介

李维杰,男(1983-),博士研究生,上海理工大学能源与动力工程学院,021-55271167, E-mail: annali@tom.com。研究方向: 生物材料低温保存。

About the author

Li Weijie(1983-), male, Ph. D., College of Energy & Power Engineering, University of Shanghai for Science and Technology, 021-55271167, E-mail: annali@tom.com. Research fields: Cryopreservation of biomaterials.