

文章编号: 1674-5566(2023)06-1109-14

DOI: 10.12024/jsou.20230504181

## 生物样品低温存储制冷技术研究进展

张安阔<sup>1</sup>, 修吉军<sup>1</sup>, 吴一骁<sup>1</sup>, 谢晶<sup>1,2,3,4</sup>

(1. 上海海洋大学 食品学院, 上海 201306; 2. 上海冷链装备性能与节能评价专业技术服务平台, 上海 201306; 3. 农业农村部冷库及制冷设备质量监督检验测试中心, 上海 201306; 4. 食品科学与工程国家级实验教学示范中心(上海海洋大学), 上海 201306)

**摘要:** 低温存储与生物医疗领域协同发展, 制冷技术可以有效地为样品低温存储提供合适的温度, 确保样品的质量控制, 为后续疾病诊断或疗效评价提供保障, 合理选择制冷技术对于低温存储与生物医疗的发展意义重大。本文分析了生物样品低温特性, 结合国内外的文献, 从冷藏、冷冻、低温、超低温 4 种温区综述了制冷技术在生物样品存储中的应用现状, 并对各种制冷技术的优缺点进行对比, 归纳出同一温区下最优制冷技术, 最后论述了制约生物样品低温存储的设备瓶颈问题, 提出了生物样品低温存储制冷技术的发展方向, 旨在为生物医疗领域制冷技术的发展提供一定的参考。

**关键词:** 低温存储; 温度影响; 制冷技术; 低温设备

**中图分类号:** TB 61; TB 658 **文献标志码:** A

医学上的生物样品通常是指用于收集和应用于健康及疾病生物体的样品, 包括生物样本、药品试剂、血液、疫苗等。在临床上, 生物医疗样品以其储存信息量大、应急性强的优势在疾病诊断或疗效评价中发挥着重要的作用<sup>[1]</sup>。然而, 生物样品对活性和指标有着严格的要求。在大多数情况下, 采集后样品不能及时用于临床试验, 对生物样品进行合理存储确保样品的使用活性显得尤为重要。

现有的存储方式主要包括低温保存以及常温添加保护剂、脱水干燥密闭等其他特殊方式<sup>[2]</sup>。低温存储样本存储温度稳定, 不受外界环境影响, 是目前生物样品的主要存储方式。表 1 为生物样品低温存储与其他方法的比较。低温可以有效地保证生物大分子的存储质量, 在蛋白质、组织的保存上与其他技术相比更具优势。

从某种程度上讲, 低温存储是保持生物样品存储活性与使用活性的关键方式, 制冷技术的发展促进了生物样品低温存储周期的延长以及存储种类的增多。生物样品从最初的细胞简单的

冷处理到 DNA 和 RNA 在  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  以下甚至更低温度下保存, 存储周期由最初的几小时到现在能够实现永久保存, 这都需要用先进的制冷技术提供更低的制冷温度以确保生物样品使用的有效性。具有高环境友好性的斯特林低温冰箱发展迅速, 为实现特殊样品超低温存储提供了保障<sup>[3]</sup>, 如美国的 SU 系列, 日本的 SC 系列。然而, 生物样品在低温存储过程对温度、冷冻速率、冷量需求等有着严格的要求, 制冷设备也需要考虑使用环境、运行能耗等因素。因此, 对制冷技术的合理选择不仅能满足不同温区样品存储需求, 同时也有助于减少设备能耗, 提高制冷效率。

本文结合低温下生物样品存储现状, 分析了低温对酶和生物分子信息的影响关系, 分温区阐述了生物样品低温存储常见的制冷技术, 根据样品的存储特点和使用需求, 归纳总结不同温区样品存储的最优制冷技术, 并对未来样品存储制冷技术的发展进行展望和总结。希望本综述能够为生物样品存储和运输中制冷技术的合理选择提供参考, 为生物医疗领域节能降耗提供帮助。

收稿日期: 2023-05-11

修回日期: 2023-06-28

基金项目: “十四五”国家重点研发计划重点专项(2022YFD2100104); 上海市科技攻关项目(20DZ2292200)

作者简介: 张安阔(1982—), 男, 副研究员, 博士, 研究方向为低温冷链制冷技术。E-mail: zhangankuo@126.com

版权所有 ©《上海海洋大学学报》编辑部(CC BY-NC-ND 4.0)

Copyright © Editorial Office of Journal of Shanghai Ocean University (CC BY-NC-ND 4.0)

<http://www.shhydx.com>

表 1 生物样品常用保存方式比较  
Tab. 1 Comparison of common preservation methods of biological samples

| 保存方式<br>Method of storage               | 温度<br>Temperature | 方法/试剂<br>Method/Reagent | 优点<br>Advantages         | 缺点<br>Disadvantages       |
|---|-------------------|-------------------------|--------------------------|---------------------------|
| 低温存储<br>Cold storage                    | 冷藏(2~8 °C)        | 半导体制冷、相变蓄冷              | 无污染、动力来源广泛               | 制冷量小                      |
|   | 冷冻(-60~-20 °C)    | 蒸汽压缩式制冷、复叠式制冷           | 制冷效率高                    | 结构复杂,产生温室气体               |
|   | 低温(-80 °C)        | 斯特林制冷                   | 结构简单、效率高、工质环保            | 初期成本较高                    |
|   | 超低温(-196~-150 °C) | 斯特林制冷、混合工质节流制冷、液氮       | 满足样品批量长期存储               | 制冷设备空间利用率低                |
| 常温存储<br>Normal temperature preservation | 常温(25~37 °C)      | 甲醛(FPE)                 | 样品组织与细胞形态学保存效果好          | 致癌性、核酸片段化                 |
|   |                   | 生物大分子稳定液<br>干式化学保存基质    | 安全稳定,空间利用率高<br>长期保存,节省时间 | 专业仪器,初期成本高<br>配比复杂,影响样品纯度 |
|   |                   | 冷冻干燥                    | 防止微生物污染,降低损失             | 操作成本较高,长期保存效果不好           |

### 1 生物样品的低温特性

几种常见的生物样品存储温度、存储时间和存储状态如图 1 所示。过高或过低的存储温度都会引起样品生物化学特性的变化,改变样品的活

性以及结构稳定性,从而影响样本的检测效果。通过提供适当的低温环境,获得最好的检测效果。本节从存储温度的角度讨论低温对酶以及生物分子信息的影响,说明生物样品低温存储的必要性。

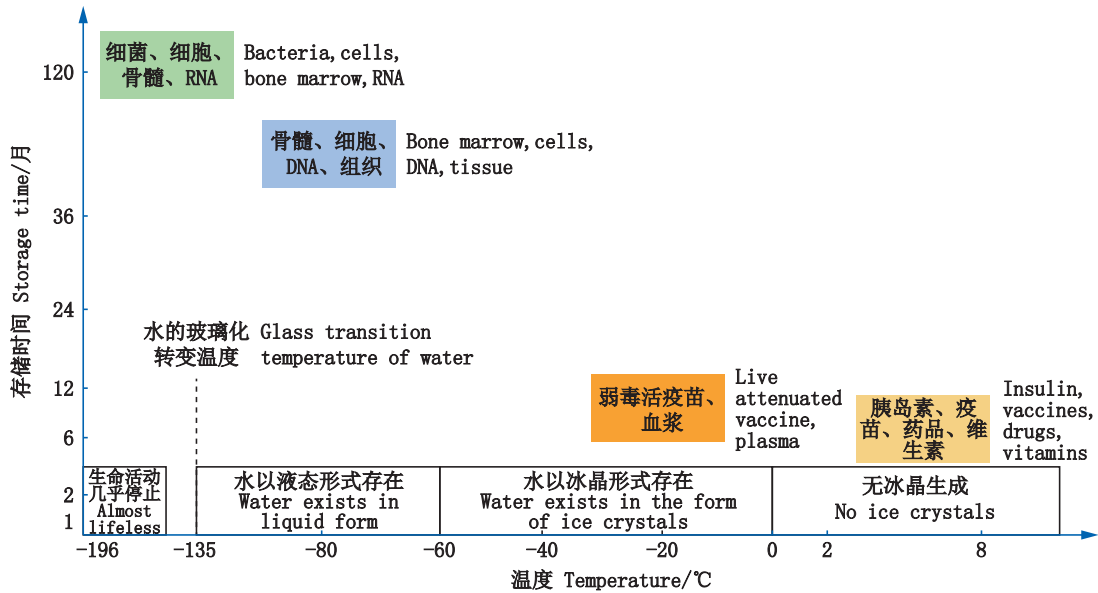


图 1 常见的生物样品、存储温度和存储时间  
Fig. 1 Storage temperature and storage time of common biological samples

#### 1.1 低温对酶的影响

影响生物样品存储的一个重要因素是酶,低温能抑制生物样品的生化活动,一切生命活动都离不开酶的参与,酶在低温下活性受到抑制,随着温度的回升,活性逐渐恢复。在酶促反应中,通常用米氏方程(Michaelis-Menten equation)来表示酶的活性与反应速率的关系<sup>[4]</sup>。

$$V_0 = V_m \times C / K_m + C \quad (1)$$

式中: $V_0$ 为反应速率, mol/s;  $K_m$ 为酶的特征常数, mol/L;  $C$ 为底物浓度, mol/L;  $V_m$ 为酶被底物饱和时的反应速率, mol/s;

酶的特征常数与底物浓度和酶浓度无关,而受温度和 pH 的影响,公式(1)中在酶的特征常数( $K_m$ )一定时,建立了反应速率( $V_0$ )与底物浓度

( $C$ )、酶被底物饱和时的反应速率( $V_m$ )之间的联系,在细胞内,底物浓度、酶被底物饱和时的反应速率为恒定值,最终影响到反应速率的是酶的特征常数 $K_m$ 。临床上采用低温麻醉时,改变了酶的特征常数值,从而使机体组织细胞中的酶在低温下活性降低,物质代谢速率减慢,对缺氧耐受度提高,复温后,对机体损伤最小,起到保护作用。以苯甲醛裂解酶(Benzaldehyde lyase enzyme)为例,在相同培养环境下, $-5\text{ }^\circ\text{C}$ 低温存储相比 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 和 $25\text{ }^\circ\text{C}$ ,酶的活性低,催化作用减弱,酶促反应效率下降,延长了生物样品的保存时间,从而达到了对样品的保护作用,实验结果如图2所示<sup>[5]</sup>。

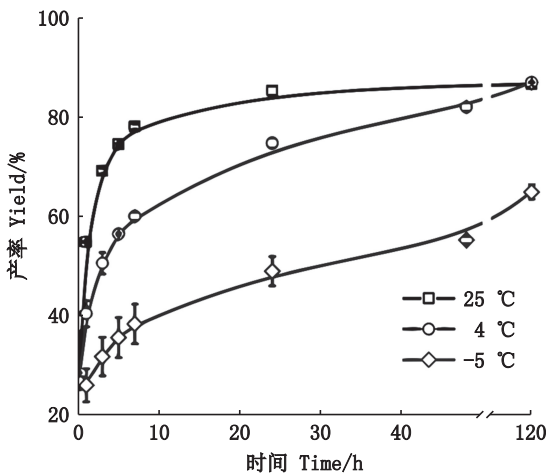


图2 苯甲醛裂解酶在25、4、 $-5\text{ }^\circ\text{C}$ 下的酶促反应动力学曲线

Fig. 2 Kinetics curves of benzaldehyde lyase enzyme at 25, 4 and  $-5\text{ }^\circ\text{C}$

另外,低温也会降低样品自身的化学反应速率,阿伦尼乌斯公式反映出化学反应速率常数随温度的变化,其表达形式如式(2)所示<sup>[6]</sup>。低温会对生物样品内部结构的活性产生影响,减缓反应过程中物质间的相互作用,从而降低化学反应速率,有利于生物样品的保存。

$$E_a = E_0 + mRT \quad (2)$$

式中: $E_a$ 为化学反应活化能, $\text{J/mol}$ ;  $T$ 为绝对温度, $\text{K}$ ;  $R$ 为摩尔气体常数, $\text{J}/(\text{mol}\cdot\text{K})$ ;  $E_0$ 、 $m$ 为由实验确定的常数。

## 1.2 低温对生物分子信息的影响

生物分子信息包括DNA、RNA、蛋白质等生物分子的序列、结构、功能等信息,其完整性是生物样本库质量的关键指标。低温存储能够抑制蛋白质多肽链水解、降低核酸自由基反应,从而

对生物分子信息起到保护作用。

EARNEST等<sup>[7]</sup>对胰蛋白酶在低温下的结构进行研究,与室温 $295\text{ K}$ 数据相比,在 $120\text{ K}$ 时,单位细胞尺寸的减小,肽链之间连接更加密集,能够在低温环境下定位更多的蛋白质原子和溶剂分子,分辨率得到明显提高,可以观察到 $295\text{ K}$ 下看不到的特征。NAKASAKO<sup>[8]</sup>利用X射线衍射实验研究了在 $100\text{ K}$ 低温下, $\beta$ 胰蛋白酶的水化结构,在 $100\text{ K}$ 时,酶周围的水合分子数是 $293\text{ K}$ 的 $1.5\sim 2.0$ 倍,水合分子的增多可以与酶的活性中心相互作用,形成氢键网络,抑制了 $\beta$ 胰蛋白酶多肽链的水解。

对于DNA来说,MROZKA等<sup>[9]</sup>发现在小于 $77\text{ K}$ 时,晶体水可以形成稳定自由基的氢键网络,降低了自由基结合的概率,减缓DNA碱基中羟基自由基的形成,这一点与低温抑制蛋白质水合分子的运动是相似的。ZHOU等<sup>[10]</sup>对全血细胞进行冷冻硅化,在 $-80\text{ }^\circ\text{C}$ 冷冻 $24\text{ h}$ ,硅酸类物质扩散到细胞核并集中,保护了细胞核内DNA的完整性,与 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 相比,冷冻硅化可以进一步降低核酸自由基反应,其DNA的半衰期可延长至 $1\ 208$ 年,图3为不同存储温度下由衰减速率常数推断DNA半衰期。低温硅化血液DNA分子破坏速率最慢,DNA完整性保存时间最长。RNA分子的核糖核苷酸在戊糖环上含有一个游离的羟基,容易发生自由基反应,导致RNA水解。RIBEIRO等<sup>[11]</sup>研究表明: $-140\text{ }^\circ\text{C}$ 储存肿瘤组织7年,RNA的完整性随存储时间长短没有发生显著变化,存储质量比 $-80\text{ }^\circ\text{C}$ 更好,其高质量的RNA样本对于临床转录研究具有重要价值。

## 2 低温存储制冷技术

生物样品低温存储,离不开制冷技术的支撑。对制冷方式合理选择,不仅能够为样品提供适宜的存储环境,确保样品使用时的活性,又可以使制冷设备降低能耗,保持较高的制冷效率,节约资源,减少成本。本章分析了样品低温存储中常见的制冷技术,结合制冷技术自身的冷冻特点和样品存储的温度需求,分析了不同温区制冷设备的使用优势,阐述了不同温区下最优的制冷技术。

### 2.1 保藏制冷技术

冷藏温区( $2\sim 8\text{ }^\circ\text{C}$ )存储生物样品的应用较为

广泛,在生物样本库、药品、疫苗、血液存储中均有所涉及,根据样品的周转量及保质期决定存储周期,通常适用于短期存储<sup>[12]</sup>。例如:血液临床应用时关注血小板的数量,GUNAWARDENA等<sup>[13]</sup>将全血在(4±2)℃、(23±2)℃、(37±2)℃下存储,与其他存储温度相比4℃全血中血小板数量在6h后基本不变。假结核杆菌在4~8℃的条件下能够长期存储,在保持活性的前提下,细菌的超微结构被破坏,毒性降低,对周期性研究肠道寄生虫病原学具有重要的科学和应用价值<sup>[14]</sup>。

2~8℃温区存储温度较高,所需制冷量较小,通常为百瓦级,生物样品在此温区常用冷藏箱保存。罗清海等<sup>[15]</sup>对半导体制冷和蒸气压缩制冷的成本进行了对比,指出半导体制冷的成本和制冷量呈线性增长关系,百瓦级的半导体制冷机相对于蒸汽压缩式制冷成本相差较小,且具有调控方便、安全可靠等优点。半导体制冷相较于传统的相变蓄冷、蒸气压缩式制冷无须制冷剂,对温度精度控制高,且动力来源广泛,适用于装置小型化的冷藏温区存储场合<sup>[16]</sup>。图4为两种不同冷却方式半导体冷藏箱示意图。

HASSAAN-YOUNIS等<sup>[17]</sup>设计了一种用于对温度敏感药品和疫苗运输的便携式半导体冷柜,有效地解决了灭活脊髓灰质炎疫苗等热敏性和冷敏性都很强的生物样品在偏远地区种类缺乏、药效低的问题,与传统蒸汽压缩制冷相比,该设

备不仅成本降低,而且节能效果显著,能够有效地维持疫苗储藏2~8℃的温度范围。

WANG等<sup>[18]</sup>比较了热侧风冷和热侧水冷两种半导体制冷板散热方式对制冷效果的影响,发现在环境温度30℃时,利用热侧风冷可使箱内平均温度维持在6℃,制冷效率比热侧水冷高,可用于生物样品长距离运输存储,图5为冷侧风速为3、4、5m/s时,箱体内的温度随时间的变化。

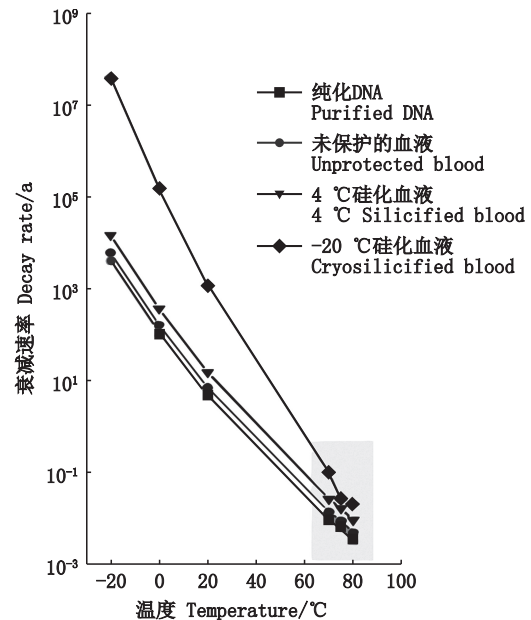


图3 不同温度、不同保存条件下血液中DNA半衰期测量值

Fig. 3 Measurement of DNA half-life in blood at different temperature and preservation conditions

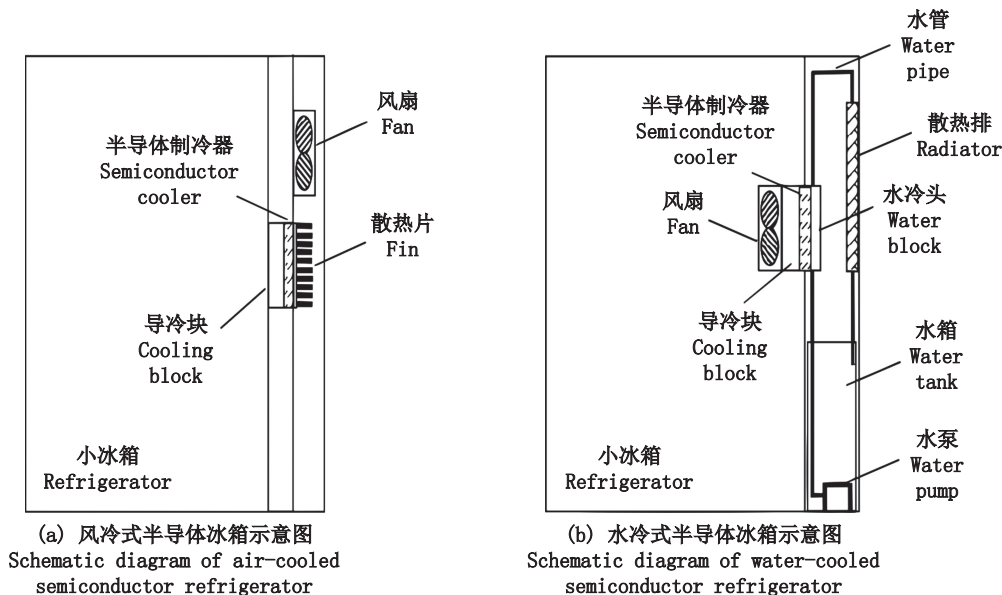


图4 不同冷却方式半导体冰箱示意图

Fig. 4 Schematic diagram of semiconductor refrigerator with different cooling modes



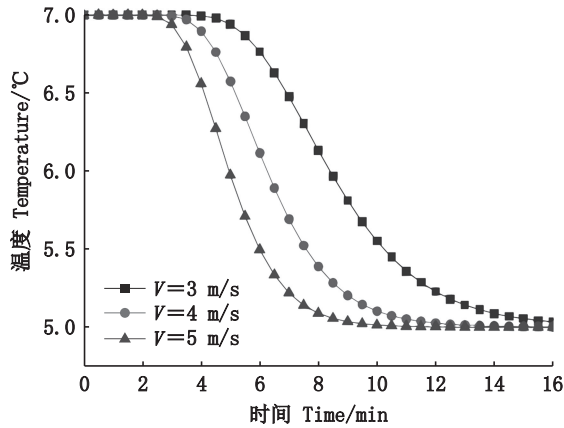


图5 不同风速下半导体制冷箱内温度变化  
Fig. 5 Temperature variation of semiconductor refrigeration chamber at different wind speeds

生物医药制剂在流水线中对温度存储精度要求高,传统的冰箱只有单项的温控功能,无法准确地获得温度值。北京工商大学研制出的半导体小型恒温箱能够保证试剂的日常保存和实验中的反应活性,在20~30℃下,启动半小时,箱内温度可达2~6℃,控温精度±0.5℃<sup>[19]</sup>。国内海尔生物医疗设计的HZY-8Z转运箱,通过半导体制冷将箱内温度控制在一定范围内,可用于将血液、药品、标本、试剂等生物制品进行转移,微电

脑控制温度,可以调整增量为0.1℃<sup>[20]</sup>。半导体制冷技术以其灵活性、多样性、可靠性等优势 and 特点,已成为生物样品保藏的关键技术。

半导体制冷能耗比低(最大约0.55),工作过程清洁无污染,而相变蓄冷材料能够有效存储冷量,减小箱体内部的温度波动,降低制冷系统能耗,为医用冷链运输提供温度环境安全保障。近年来,对相变蓄冷材料冷链保存的研究取得一定的成效。LIU等<sup>[21]</sup>以癸醇(DA)和月桂酸(LA)为共晶,探索出一种新型相变蓄冷材料,以满足疫苗冷链物流2~8℃的需求,加入膨胀石墨材料复合后,具有较高的潜热和热导率,相变温度为2.08℃,相变时间大大缩短。实验表明,在环境温度31℃下,冷藏箱内每块蓄冷板能稳定保持2~8℃接近10h,可以有效地缓解疫苗在运输过程中变质的问题。上海海事大学根据药品冷链物流的温度要求,研制相变温度为2~8℃的相变材料,针对有机相变材料导热性能较低的特点,加入膨胀石墨(EG)来提高导热性能,用于疫苗冷藏箱在2~8℃最长保温47.73h<sup>[22]</sup>。实验用相变材料疫苗冷藏箱如图6所示。未来,高相变潜热值、低相变温度、高导热系数的相变储冷材料配套储冷模块是满足医疗冷链运输需求的发展方向。

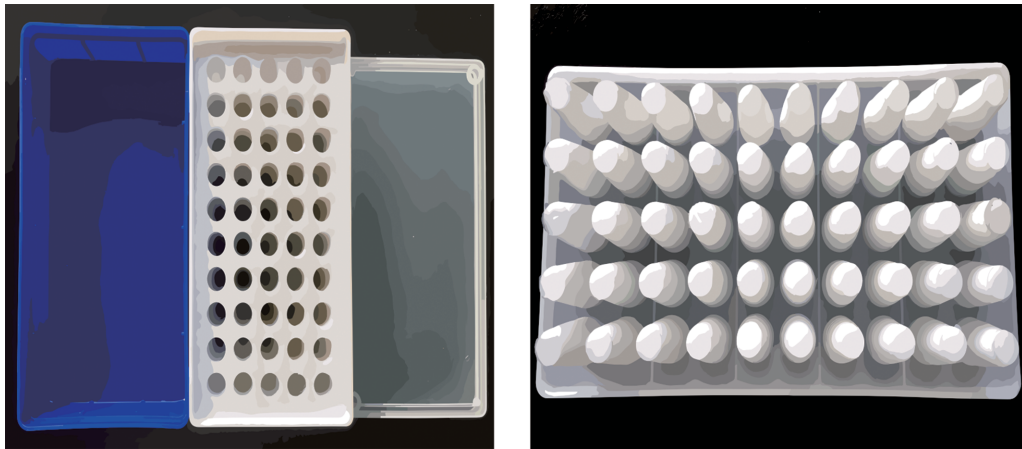


图6 疫苗冷藏箱  
Fig. 6 Vaccine cold storage box

表2总结了近年来国内外文献中提到的半导体冰箱与相变蓄冷箱,列出了其主要性能参数。

2.2 冷冻制冷技术

-60~-20℃温区,细胞内的水分以冰晶形式存在,容易对细胞和组织的微观结构造成损害,疫苗和血浆由于存储周期和使用周期较长,在

-60~-20℃存储时,活性指标比较稳定<sup>[24]</sup>。例如:弱毒活疫苗的存储在-25~-15℃,当温度低于-25℃,则会破坏疫苗瓶内的真空度,影响疫苗的效价<sup>[25]</sup>。新鲜冷冻血浆(FFP)在采血、制备和储存过程中会暴露于多种影响凝血因子的质量和稳定性的因素中,德国巴伐利亚州红十字会将捐

献的血浆在 18 h 内置于  $-42\sim-38\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 实现了  $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$  下储存 3 年, 且 FFP 中凝血参数不低于起始的 70%, 在可接受的范围内, 保证了凝血因子活性的同时, 实现了血浆的低温长周期存储<sup>[26]</sup>。

表 2 近年来半导体制冷和相变蓄冷在样品保存中的应用

Tab. 2 Recent applications of semiconductor refrigeration and phase change cooling in sample preservation

| 时间<br>Year | 制冷技术<br>Refrigeration<br>technology | 环境温度<br>Ambient<br>temperature/ $^{\circ}\text{C}$ | 箱体尺寸<br>Cabinet size/<br>mm | 箱内温度<br>Internal temperature<br>of refrigerator/ $^{\circ}\text{C}$ | 降温<br>时间<br>Cooling<br>time/s | 用途<br>Application | 参考文献<br>Reference                |
|------------|-------------------------------------|--|-----------------------------|---|-------------------------------|-------------------|----------------------------------|
| 2013       | 半导体制冷                               | 25   | 350×300×135                 | 2~6   | 1 800                         | 日常保存试剂            | LIU 等 <sup>[19]</sup>            |
| 2018       | 半导体制冷                               | 16   | 250×90×100                  | 2   | 1 500                         | 偏远地区疫苗冷链          | HASSAAN-YOUNIS 等 <sup>[17]</sup> |
| 2019       | 半导体制冷                               | 30   | 560×405×445                 | 6   | -                             | 生物样品长距离运输         | WANG 等 <sup>[18]</sup>           |
| -          | 半导体制冷                               | 10~25  | 300×260×260                 | 2~6   | -                             | 转移生物样品            | 海尔生物 HZY-8Z <sup>[20]</sup>      |
| 2018       | 烷烃蓄冷剂                               | 30   | 600×600×400                 | 2~8   | -                             | 医药类冷链运输           | 潘欣艺 <sup>[23]</sup>              |
| 2021       | 共晶相变材料                              | 31   | 850×850×800                 | 2~8   | -                             | 疫苗运输              | LIU 等 <sup>[21]</sup>            |

$-60\sim-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  属于常规的制冷温区, 市面上多以双级压缩式制冷技术和复叠式制冷技术为主, 根据样品的保存温度需求以及制冷系统的使用效率, 又有不同的选择。葛长伟等<sup>[27]</sup>通过研究得出, 当冷库蒸发温度在  $-35\text{ }^{\circ}\text{C}$  以下时, R744/R717 复叠式制冷系统 COP 高于普通双级压缩氨制冷系统 COP, 且在  $-55\sim-35\text{ }^{\circ}\text{C}$  随蒸发温度降低, 两者差距加大, 在  $-45\text{ }^{\circ}\text{C}$  蒸发温度下, 复叠式制冷系统比氨系两级系统 COP 高 8.8%, 比常规搭配制冷系统效率高 10%。图 7 为 R744/R717 复叠式制冷系统与氨双机搭配系统制冷效率比较, 从图中可知, 在  $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$  时双级压缩氨系统 COP 略高于复叠式制冷系统, 但二者相差不大。

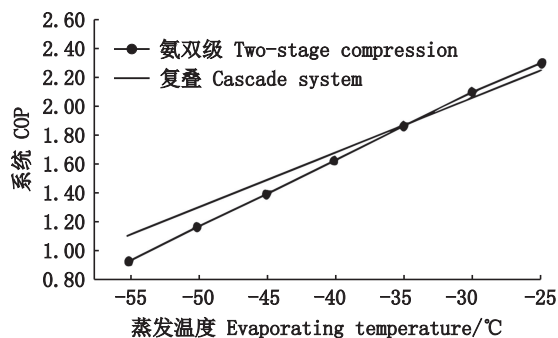


图 7 R744/R717 复叠制冷系统与双级压缩氨制冷系统制冷效率比较

Fig. 7 Comparison of refrigeration efficiency between R744/R717 cascade refrigeration system and two-stage compressed ammonia refrigeration system

与双级压缩机相比, 复叠式制冷气缸总容积大大减少, 能耗下降。韩国釜庆大学比较了 R744-R404A 复叠式制冷系统和 R404A 两级压缩制冷系统的性能, 研究表明在  $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$  时, 两级压缩制冷系统在蒸发温度和压缩机效率降低的情况下, COP 会显著降低, 长期使用效率不高<sup>[28]</sup>。因此, 在  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  温区低温存储生物样品时, 考虑到长期使用制冷设备的使用寿命和系统复杂性, 可以用复叠式制冷系统替代双级压缩系统。

复叠式制冷技术工作效率较高, 广泛应用于  $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$  以下低温存储生物样品。李文林等<sup>[29]</sup>以 R13/R12 为工质对, 在容积为 70 L 的低温箱中得到了  $-55\text{ }^{\circ}\text{C}$  的温度, COP 为 11.4%。天津大学热能研究所在此基础上进行改进, 采用 R22/R23 作为制冷工质对, 并利用冷凝分离器的水冷自复叠制冷循环, COP 提升率达 60%~100%, 在维持低温冰箱所需制冷量的同时, 提高了制冷效率<sup>[30]</sup>。近年来, 生命科学研究进程不断加快, 对生物样品的需求与日俱增, 医疗低温存储设备的定位不仅仅是存储, 更多在于保障样本的质量以及实现样本信息的有效管理, 因而对设备自动化程度提出了更高的要求。国内海尔生物医疗自主研发的自动化血浆冷库(图 8)采用复叠式制冷技术, 通过机械手快速平稳运输血浆, 存储过程全自动化进行, 减小了库内温度波动, 将温度控制在  $-30\sim-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ <sup>[31]</sup>。

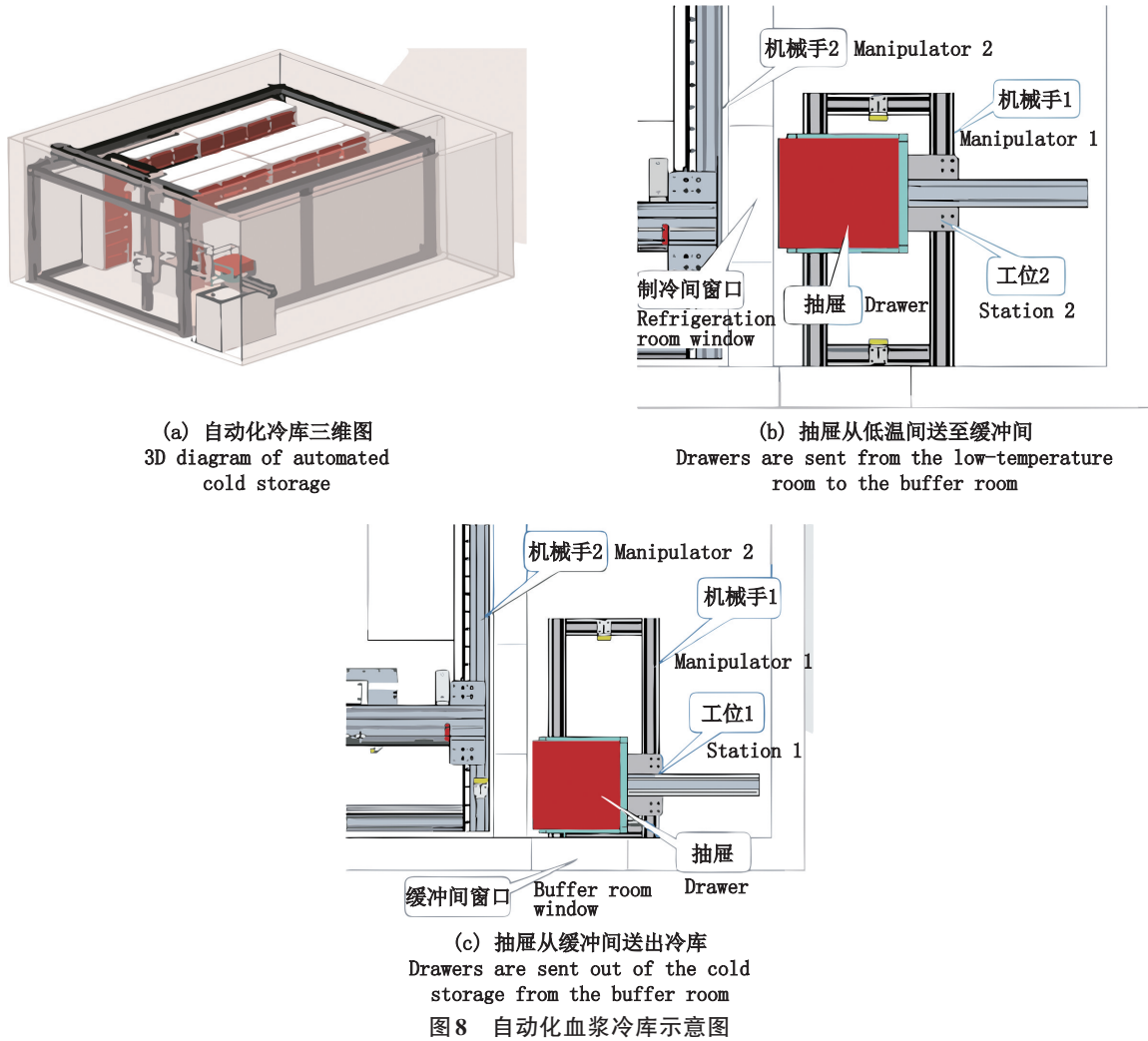


图 8 自动化血浆冷库示意图  
Fig. 8 Schematic diagram of automated plasma cold storage

玉树信等<sup>[32]</sup>依托超低温速冻冷藏实验台,基于LabVIEW开发了复叠式制冷的自动化远程监测系统,在冷库内设置了50个温度测点,自动化程度高,低温循环制冷剂质量流量能够随着冷库内温度的降低逐渐减小,制冷系统运行稳定可靠,人机交互界面友好。

天津商业大学以R404A/R508B为高低温制冷工质,搭建复叠式超低温冷库,模拟RH阴性血液在 $-80^{\circ}\text{C}$ 的保存环境,研究发现当复叠式系统蒸发温度从 $-57^{\circ}\text{C}$ 降低到 $-80^{\circ}\text{C}$ 时,制冷量减小了21%,虽然达到预期实验要求,但由于压缩机排气温度较高且增加了中间补气口,导致整个系统庞大复杂,大大增加了工作量,在 $-80^{\circ}\text{C}$ 下长期使用效率不高<sup>[33]</sup>。复叠式制冷技术对混合制冷剂选择合理,可以实现不同温区灵活制冷,在 $-80^{\circ}\text{C}$ 以上存储生物医疗样品温度稳定,制冷效率较高,

在国内外低温存储领域有广阔的市场。

### 2.3 低温制冷技术

$-80^{\circ}\text{C}$ 远低于水的结晶温度,是较常用的样本保存温度,样本内的生化反应显著减弱,能够较长期地保存生物样本库的活性。例如:红细胞在冷藏温区适合短期存储,随着储存时间的增加,红细胞的自氧化是一个不可避免的问题,医学上长期存储,为了防止红细胞的自氧化和去酰化,通常采取 $-80^{\circ}\text{C}$ 低温保存<sup>[34]</sup>。DNA的稳定性较好,可以在 $-80^{\circ}\text{C}$ 下保持数年或更长时间,但RNA则容易被广泛分布于细胞和各种组织里的RNA酶降解,在 $-80^{\circ}\text{C}$ 下保存时间较短,通常为数月<sup>[35]</sup>。

目前,对于 $-80^{\circ}\text{C}$ 存储生物样品,市面上多采用低温冰箱搭配复叠式制冷技术,由于制冷系统复杂程度提高,复叠式制冷效率低下,运行稳定性下降。斯特林制冷机具有结构紧凑、质量轻、



工作温度范围宽、效率高等优点,在-80 °C以下温区优势明显<sup>[36-37]</sup>。

KIM 等<sup>[38]</sup>将线性驱动的β型斯特林制冷机用于超低温冰箱进行实验,测试了回热器材料对制冷机动态性能和冷却性能的影响,结果表明:在-100 °C,输入功率为 592 W 时,制冷量为 234 W, COP 为 0.396,比同温度下复叠式制冷效率更高。箱体可以稳定维持在-80 °C,保证了生物试剂的低温存储要求。

美国 Global Cooling 公司在-80 °C 温区下,分别对两级复叠式制冷系统和斯特林制冷系统的低温冰箱正常工作下的性能进行了测试,发现在冷端温度达到-90 °C 时,复叠式制冷系统的 COP 约为 0.25,斯特林制冷系统的制冷系数约为 0.39。复叠式制冷系统通过反复的开关通断来调节制冷能力会使得其 COP 降低至 0.2 左右;斯特林制冷系统则可以在连续运转的同时通过改变活塞的振幅来调节制冷能力,因此斯特林制冷系统的制冷效率要高于复叠式制冷系统。该公司又对低温冰箱 10 年使用寿命中的耗能以及 CO<sub>2</sub> 排放量进行了估算,如图 9 和图 10 所示<sup>[39]</sup>。

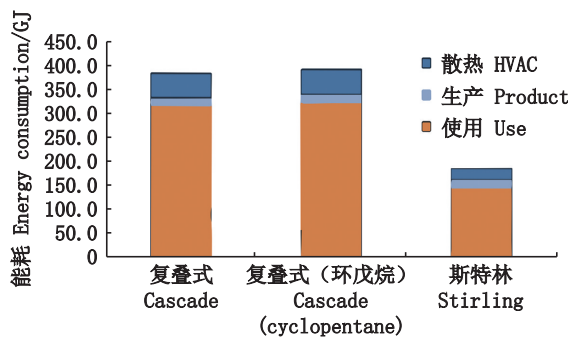


图 9 低温冰箱 10 年寿命总耗能量  
Fig. 9 Embodied, use and HVAC energy over a 10-year life

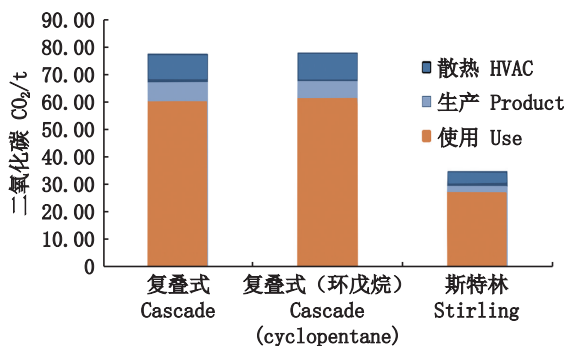
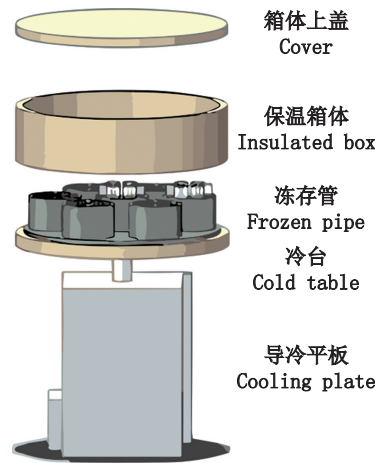


图 10 低温冰箱 10 年寿命总 CO<sub>2</sub> 排放量  
Fig. 10 Embodied, use and HVAC CO<sub>2</sub> over a 10-year life

由图 9 和图 10 中可以得出,在相同的运行情况下,使用斯特林制冷系统的低温冰箱耗能和 CO<sub>2</sub> 排放均比使用两级复叠式制冷系统的低温冰箱减少了一半以上。

复叠式制冷系统结构复杂,系统分散,在-80 °C 以下制冷效率低,近年来,低温技术迭代升级,以斯特林制冷技术为支撑的生物医疗领域快速发展,斯特林低温冰箱逐渐被应用于生物样品存储。

中国科学院上海技术物理研究所研制了一台有效容积为 750 L,工作温度低于-80 °C 的低温冰箱,采用四台整体式斯特林制冷机,在环温 15 °C,输入功率 1 600 W 时,箱内温度可达-83 °C,温度均匀,为样品提供良好的储存环境<sup>[40]</sup>。上海理工大学针对部分新冠疫苗的-70 °C 低温需求,以斯特林制冷机为冷源,对冷链箱冷台的高度与半径进行选型,确定最佳降温效果,在-80 °C 容纳 49 支疫苗时,箱体仍保持 4.5 °C/min 的降温速率降温,满足疫苗的深低温储存及转运需求<sup>[41]</sup>。图 11 为冷链箱结构设计图。



斯特林制冷机 Stirling cooler

图 11 冷链箱结构设计图

Fig. 11 Cold chain box structure design drawing

斯特林制冷系统是目前主要的低温制冷系统之一<sup>[38-39]</sup>,相对于复叠制冷系统而言,小型斯特林制冷系统具有制冷温度范围灵活、体积小、便于携带等优点。不管是在低温制冷效率,还是在运行的性能上都有复叠式制冷技术不可替代的优势,是深低温生物医疗样品存储发展的方向。

### 2.4 超低温制冷技术

-196~-150 °C 温区低于水的玻璃化转变温



度,可以有效防止细胞内微细冰晶的形成,确保生物大分子的稳定性,细胞活性及组织微观结构的完整,能够满足生物大分子、细胞、病毒等生物样品的长期存储需求,在-196 °C时,生物活性物质可以实现永久保存<sup>[42-43]</sup>。例如:KELLY等<sup>[44]</sup>在-180 °C保存肿瘤组织标本 11年后,通过测量组织内RNA完整性数(RIN),观察到组织RNA的质量没有随时间而下降;海军总医院血液科使用液氮(-196 °C)冻存骨髓 25年,复温后传代培养,检测培养全过程细胞形态、增殖数量、抗原表达正常,骨髓中干细胞活力良好<sup>[45]</sup>。在此温区下,通常采用液氮制冷、混合工质节流制冷技术以及斯特林制冷技术来实现生物样品超低温存储。表 3 比较了 3 种超低温制冷技术。

液氮罐设备保温性能良好,内部有液氮吸附体以吸收和保存液氮,能够有效保障罐内生物样品在-196 °C长期储存,常用于深低温环境小批量保存或生物样本运输,如图 12 所示。中南大学湘

雅三医院用液氮罐保存组织样本并与-80 °C冰箱进行对比,测定不同保存方式对生物大分子的影响,发现液氮罐保存的组织样本蛋白浓度、RNA纯度始终较为稳定,其他条件相同时,-80 °C冰箱只能保存半年<sup>[46]</sup>。

与液氮相比,低温氮气保存样本与液氮各自独立,降低了微生物污染的风险。ROWLEY等<sup>[47]</sup>解决了低温氮气冰箱中存在较大温度梯度的问题,使用铝制框架系统,利用铝的高热导率,将低温氮气冰箱低温区与高温区的温度梯度控制在 5.9 °C,最高温保持在-182.8 °C以下,从而证明了在低温氮气冰箱中实现骨髓细胞保存的稳定性与可靠性,在稳定的温度下存储,避免液体浸泡中样本交叉污染的风险。国内原能细胞自主研发的BSN-600自动化存储设备(图 13)通过对内部核心部件的远程监控,实现-196 °C低温氮气存储环境,其蜂巢式存储结构能防止交叉污染,空间利用率高,在深低温环境更加均衡稳定<sup>[48]</sup>。

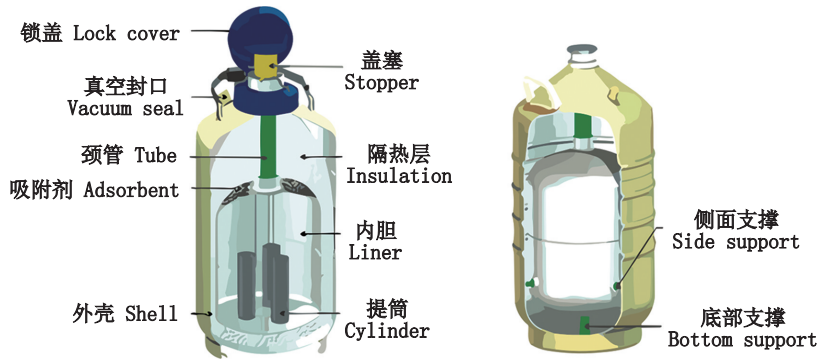


图 12 液氮罐内部结构示意图  
Fig. 12 Schematic diagram of internal structure of liquid nitrogen tank

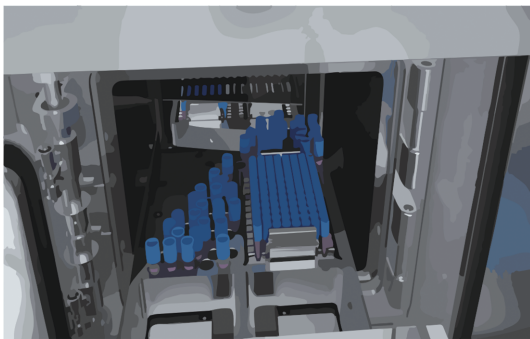


图 13 BSN-600 生物样本全自动入库  
Fig. 13 Automatic storage of BSN-600 biological samples

除了液氮设备之外,深冷冰箱为大批量生物样品的长期保存提供稳定的低温环境,在医药及

生物制品领域具有广泛而重要的需求,现有研究主要可以分为混合工质节流制冷和斯特林制冷两种方式。

混合工质节流制冷技术是由不同沸点的纯工质组元构成多元混合物工质,可以实现大温跨范围内制冷,现有研究集中于混合工质组分,确保循环温度的稳定性,对其在液氮温区深冷冰箱的应用研究较少且 COP 较低。中国科学院理化技术研究所研制了-186 °C的深冷冰箱,采用混合工质节流制冷技术,在输入功率 2.03 kW 时,可在 95 K 的制冷温度下获得 101 W 制冷量,相对卡诺效率 11%,内部有效容积 80 L,利用率高,约等于 300 L 液氮容器,可在 2 h 内降温至-180 °C,如图

14<sup>[49]</sup>所示。通过箱内负载实现高精度控温,与液氮罐相比,具有较大优势<sup>[49-50]</sup>。

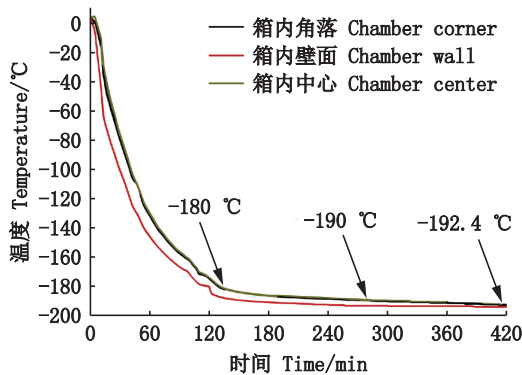


图14 -186 °C深冷冰箱典型降温曲线图  
Fig. 14 Typical cooling curve of -186 °C cryogenic refrigerator

KO等<sup>[51]</sup>研发了一种线性压缩机驱动的特林制冷机,用于深冷冰箱存储生物样品,可在-150 °C实现159 W制冷量,COP为0.186。海尔生物医疗与上海理工大学合作,将斯特林制冷机与热管耦合低温制冷技术应用在低温冰箱上,将

冷量均匀地传输到冰箱内部,存储温度稳定性大幅提高,同时采用对置噪声消减技术,制冷机运行时噪声显著降低,为生物样本-160 °C深低温存储提供可靠支撑<sup>[52]</sup>。图15为环绕式深低温重力热管示意图。

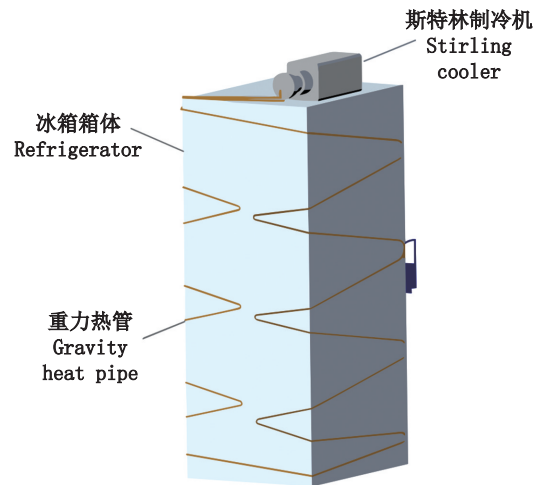


图15 低温冰箱环绕式重力热管示意图  
Fig. 15 Schematic diagram of encircled gravity heat pipe in cryogenic refrigerator

表3 超低温制冷设备比较  
Tab. 3 Ultra-low temperature refrigeration equipment comparison

| 制冷设备<br>Refrigeration equipment | 制冷技术<br>Refrigeration technology | 制冷剂<br>Refrigerant | COP                   | 输入功率<br>Power input/W | 制冷温度<br>Cooling temperature/°C | 制冷量<br>Cooling capacity/W | 内部有效容积<br>Effective volume/L | 结构复杂程度<br>Structural complexity |
|---------------------------------|----------------------------------|--------------------|-----------------------|-----------------------|--------------------------------|---------------------------|------------------------------|---------------------------------|
| 深冷冰箱<br>Cryofreezer             | 混合工质节流制冷                         | 多种非共沸组元            | <0.11 <sup>[39]</sup> | 2 030                 | -170                           | 101                       | 80                           | 高                               |
|                                 | 斯特林制冷                            | 氦气(0污染)            | 0.186 <sup>[40]</sup> | 850                   | -150                           | 159                       | -                            | 低                               |
| 液氮罐<br>Liquid nitrogen tank     | 液氮制冷                             | 液氮、低温氮气            | -                     | -                     | -196~-150                      | -                         | 空间利用率低                       | 高                               |

### 3 结论与展望

本文综述了制冷技术在生物样品低温存储的研究现状,从生物样品的低温特性出发,阐明低温存储的必要性,通过对存储温区制冷技术的应用比较分析,总结出该存储温区下最优制冷技术,可以得出生物样品低温存储制冷技术的发展方向。

(1)由单一制冷过渡为复合制冷。2~8 °C保藏生物样品所需制冷量小,半导体制冷技术结合相变蓄冷技术温控精度高,能耗少,在样品的转移运输中有较好的发展前景;在深低温区,斯特

林制冷技术与混合工质节流制冷技术相比,COP更高,制冷剂无污染,制冷量方便可调,将斯特林深冷冰箱与液氮罐联合使用,满足不同需求量的样品存储,在温度控制上也更加灵活。

(2)制冷技术迭代发展。-80 °C以下温区存储市面上仍以复叠式制冷技术为主,在增加生产成本的同时,制冷系统更加复杂,用于样品存储时稳定性下降;以斯特林制冷机为代表的小型低温制冷机经过几十年的发展,不管是在低温制冷效率,还是在运行的可靠性等性能均得到验证,是深低温冷源迭代升级的方向。

(3)低温存储设备更加自动化。自动化存储

在减少温度波动的同时也可以减少制冷设备的工作压力,如海尔生物医疗在自动化血浆存储冷库中使用机械手快速平稳运输血浆,减少了库内温度波动。自动化存储通过对核心部件远程监控实现精准控温,避免了传统人工存取样品时产生温度波动和交叉污染,存储效果优势明显。

尽管制冷技术在生物样品存储上取得一定的成效,在各温区样品储存发展前景良好,但现有应用中仍存在问题值得研究:(1)新型相变蓄冷材料及其配套储冷模块的研发,归纳相变蓄冷材料的布置方式对箱内温度分布的影响;(2)规范深冷冰箱的启停方式,避免产生较大的温度波动,提高能量利用效率;(3)降低液氮罐开盖查找样本的时间,避免冷热掺混导致液氮消耗量大;(4)建立和完善新型复合制冷系统用于生物样品存储选型和适配的理论指导模型。

#### 参考文献:

- [1] CHANIHOON G Q, AFRIDI H I, UNAR A, et al. Selenium and mercury concentrations in biological samples from patients with COVID-19 [J]. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology : Organ of the Society for Minerals and Trace Elements (GMS)*, 2022, 73: 127038.
- [2] 王敏,李倩,吕志宝,等. 生物样本的常用保存方式及效果[J]. *中华病理学杂志*, 2016, 45(11): 807-810.  
WANG M, LI Q, LYU Z B, et al. Common preservation methods of biological samples and their effects [J]. *Chinese Journal of Pathology*, 2016, 45(11): 807-810.
- [3] 陈州旗,刘宝林,宋晓燕,等. 生物样本速冻装置冷台模拟研究[J]. *制冷学报*, 2019, 40(3): 159-166.  
CHEN Z Q, LIU B L, SONG X Y, et al. Simulation on the cooling stage of quick freezing device for biological samples [J]. *Journal of Refrigeration*, 2019, 40(3): 159-166.
- [4] SAGANUWAN S A. Application of modified Michaelis - Menten equations for determination of enzyme inducing and inhibiting drugs [J]. *Bmc Pharmacology & Toxicology*, 2021, 22(1): 57.
- [5] ZHOU T, YAO Y, ZHANG Q, et al. Cryogenic activity and stability of benzaldehyde lyase enzyme in lipidic mesophases-nanoconfined water [J]. *Chemical Communications*, 2021, 57(46): 5650-5653.
- [6] 方志刚. 聚丙烯使用寿命预测方法[J]. *合成材料老化与应用*, 2018, 47(6): 54-56.  
FANG Z G. Lifetime prediction method of polypropylene [J]. *Synthetic Materials Aging and Application*, 2018, 47(6): 54-56.
- [7] EARNEST T, FAUMAN E, CRAIK C S, et al. 1.59 A structure of trypsin at 120 K: comparison of low temperature and room temperature structures [J]. *Proteins Structure Function and Bioinformatics*, 1991, 10(3): 171-87.
- [8] NAKASAKO M. Large-scale networks of hydration water molecules around bovine beta-trypsin revealed by cryogenic X-ray crystal structure analysis [J]. *Journal of Molecular Biology*, 1999, 289(3): 547-564.
- [9] MROCZKA N E, MERCER K R, BERNHARD W A. The effects of lattice water on free radical yields in x-irradiated crystalline pyrimidines and purines: A low-temperature electron paramagnetic resonance investigation [J]. *Radiation Research*, 1997, 147(5): 560-568.
- [10] ZHOU L, LEI Q, GUO J, et al. Long-term whole blood DNA preservation by cost-efficient cryosilicification [J]. *Nature Communications*, 2022, 13(1): 6265.
- [11] RIBEIRO OLIVIERI E H, FRANCO L D A, PEREIRA R G, et al. Biobanking practice: RNA storage at low concentration affects integrity [J]. *Biopreservation and Biobanking*, 2014, 12(1): 46-52.
- [12] 梁玮,王美霞,刘宝林. 低温保存对生物样本及其生物大分子的影响[J]. *中国生物医学工程学报*, 2017, 36(5): 615-621.  
LIANG W, WANG M X, LIU B L. The effect of cryopreservation on biospecimens and biomacromolecules [J]. *Chinese Journal of Biomedical Engineering*, 2017, 36(5): 615-621.
- [13] GUNAWARDENA D, JAYAWEERAS, MADHUBHASHINI G, et al. Reliability of parameters of complete blood count with different storage conditions [J]. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 2017, 31(2): 6.
- [14] SOMOVA L M, TIMCHENKO N F, LYAPUN I N, et al. Ultrastructural changes of bacteria in static cultures of *Yersinia pseudotuberculosis* under long storage under conditions of low temperature [J]. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 2020, 170(2): 223-225.
- [15] 罗清海,汤广发,李涛. 半导体制冷空调的应用与发展前景[J]. *制冷与空调*, 2005(6): 5-9.  
LUO Q H, TANG G F, LI T. Review and application of thermoelectric air conditioning [J]. *Refrigeration and Air-Conditioning*, 2005(6): 5-9.
- [16] 邱兰兰,王瑜,朱洁茹,等. 应用半导体制冷的冷藏链用储藏箱性能实验研究[J]. *制冷学报*, 2020, 41(1): 131-140.  
QIU L L, WANG Y, ZHU J R, et al. Experimental research on the performance of storage box with semiconductor refrigeration applied in cold chain [J]. *Journal of Refrigeration*, 2020, 41(1): 131-140.
- [17] HASSAAN-YOUNIS M, HAROON-UR-R. Energy efficient, peltier based portable cabinet cooling system for vaccine cold chain [C]// *Proceedings of the 4th*



- International Conference on Power Generation Systems and Renewable Energy Technologies, Islamabad: Institute of Electrical and Electronics Engineers, 2018: 30-33.
- [18] WANG Y, QIU L, LIU J, et al. Performance of a fresh-food storage box based on semiconductor refrigeration [J]. Sustainable Cities and Society, 2019, 49(4): 101599.
- [19] LIU J, XU C G, XIANG H Y, et al. Applications in medical reagent test equipment of semiconductor refrigeration [J]. Applied Mechanics and Materials, 2013, 325-326: 703-707.
- [20] HAIER B. 2022 Refrigerated transfer box HZY-8ZA [EB/OL]. (2022-8-30) [2022-10-17]. haierbiomedical.com
- [21] LIU L, ZHANG X, XU X, et al. Development of low-temperature eutectic phase change material with expanded graphite for vaccine cold chain logistics [J]. Renew Energy, 2021, 179: 2348-2358
- [22] ZHAO Y, ZHANG X, XU X, et al. Development of composite phase change cold storage material and its application in vaccine cold storage equipment [J]. Journal of Energy Storage, 2020, 30.
- [23] 潘欣艺. 保温材料与蓄冷剂对医药保温箱内温度分布影响研究[D]. 杭州: 浙江理工大学, 2018.  
PAN X Y. Temperature field analysis in medicine incubator by thermal insulation material and ctesms [D]. Hangzhou: Zhejiang Sci-Tech University, 2018.
- [24] ILLERT W E, BUTSCH H, NUBER D, et al. Long-term storage multicenter study of fresh frozen plasma at -40 °C. A multicenter study on the stability of labile coagulation factors over a period of 3 years [J]. Transfusion Medicine & Hemotherapy, 2001, 28(4): 189-194.
- [25] 郭志珍. 动物疫苗运输与贮存管理措施 [J]. 畜禽业, 2018, 29(5): 51.  
GUO Z Z. Management measures for transport and storage of animal vaccines [J]. Livestock and Poultry Industry, 2018, 29(5): 51.
- [26] ILLERT W E, BUTSCH H, NUBER D, et al. Long-term storage multicenter study of fresh frozen plasma at -40 degrees C. A multicenter study on the stability of labile coagulation factors over a period of 3 years [J]. Infusion Therapy and Transfusion Medicine-Infusionstherapie Und Transfusionsmedizin, 2001, 28(4): 189-194.
- [27] 葛长伟, 姜韶明, 于志强. NH<sub>3</sub>/CO<sub>2</sub> 制冷系统的研究 [J]. 制冷技术, 2014, 34(3): 22-28.  
GE C W, JIANG S M, YU Z Q. Research on NH<sub>3</sub>/CO<sub>2</sub> refrigeration system [J]. Chinese Journal of Refrigeration Technology, 2014, 34(3): 22-28.
- [28] SON C-H. Performance comparison of cascade refrigerator and two-stage compression refrigerator [J]. Journal of the Korea Academia-Industrial cooperation Society, 2014, 15(2): 625-631.
- [29] 李文林, 华小龙. 混合工质制冷循环的试验研究 [J]. 流体工程, 1987(4): 53-55, 65.
- LI W L, HUA X L. Experimental study on refrigerating cycle of mixed working medium [J]. Fluid Machinery, 1987(4): 53-55, 65.
- [30] 杨永安, 杨昭, 刘斌. -60°C 水冷自复叠制冷系统研究 [J]. 制冷学报, 2015, 36(2): 52-58.  
YANG Y A, YANG Z, LIU B. Study of water-cooled auto-cascade refrigeration cycle with a low temperature of -60 °C [J]. Journal of Refrigeration, 2015, 36(2): 52-58.
- [31] 王超. 影响机械手冷库重复定位精度和可靠性若干问题的研究 [D]. 青岛: 青岛大学, 2018.  
WANG C. Study of several problems affecting the repeat positioning accuracy and reliability of robotic cold storage [D]. Qingdao: Qingdao University, 2018.
- [32] 王树信, 王金锋, 谢晶, 等. 基于 LabVIEW 的复叠式制冷远程监测系统 [J]. 国外电子测量技术, 2018, 37(3): 108-112.  
WANG S X, WANG J F, XIE J, et al. Remote monitoring system for cascade refrigeration based on LabVIEW [J]. Foreign Electronic Measurement Technology, 2018, 37(3): 108-112.
- [33] 孙建军, 申江, 康方圆. 应用于血液冷库的双级复叠系统的实验研究 [J]. 低温与超导, 2019, 47(6): 106-110.  
SUN J J, SHEN J, KANG F Y. Experimental study on cascade system in blood cold storage [J]. Cryogenics and Superconductivity, 2019, 47(6): 106-110.
- [34] DI MARINO L, MAFFETTENE A, CIPRIANO P, et al. Assay of erythrocyte membrane fatty acids. Effects of storage time at low temperature [J]. International Journal of Clinical & Laboratory Research, 2000, 30(4): 197-202.
- [35] LOU J J, MIRSADRAEI L, SANCHEZ D E, et al. A review of room temperature storage of biospecimen tissue and nucleic acids for anatomic pathology laboratories and biorepositories [J]. Clinical Biochemistry, 2014, 47(4/5): 267-273.
- [36] 刘业凤, 陈申, 周国梁. 斯特林型低温冰箱的试验研究 [J]. 流体机械, 2018, 46(1): 69-72, 88.  
LIU Y F, CHEN S, ZHOU G L. Experimental research of low temperature refrigerator with Stirling-type pulse tube cooler [J]. Fluid Machinery, 2018, 46(1): 69-72, 88.
- [37] 高野真延, 徐先盛. 低温储罐用金属材料 [J]. 炼油设备设计, 1984(4): 58-65.  
MASAYUN T, XU X S. Metal materials for cryogenic storage tanks [J]. Petrochemical Equipment Technology, 1984(4): 58-65.
- [38] KIM H-B, PARK J, WOO K J, et al. Development of stirling cooler for ultra low temperature freezer [J]. Journal of Power System Engineering, 2020, 24(6): 67-74.
- [39] BERCHOWITZ D M, KWON Y. Environmental profiles of stirling-cooled and cascade-cooled ultra-low temperature

- freezers[J]. Sustainability, 2012, 4(11): 2838-2851.
- [40] 庄禾, 谢荣建, 刘博轩, 等.  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 斯特林低温冰箱研制[J]. 低温工程, 2017(5): 65-70.  
ZHUANG H, XIE R J, LIU B X, et al. Development of a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  Stirling-cooled low temperature refrigerator [J]. Cryogenics, 2017(5): 65-70.
- [41] 李虎飞, 陈州旗, 王建信, 等. 基于斯特林制冷超低温疫苗冷链箱的设计研究[J]. 制冷技术, 2021, 41(5): 100-104, 110.  
LI H F, CHEN Z Q, WANG J X, et al. Research on design of ultra-low temperature cold chain box for vaccine storage based on Stirling ultracold [J]. Chinese Journal of Refrigeration Technology, 2021, 41(5): 100-104, 110.
- [42] 高明宏, 张劲松, 蓝平. 超低温( $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ )保存角膜缘上皮细胞的生物活性研究[J]. 中国实用眼科杂志, 2006(6): 658-662.  
GAO M H, ZHANG J S, LAN P. Viability of the rabbits' corneal limbal epithelial cells cryopreserved at  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$  [J]. Chinese Journal of Practical Ophthalmology, 2006(6): 658-662.
- [43] 苏新. 浙贝母愈伤组织的超低温( $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ )保存[J]. 现代应用药学, 1990(4): 18-19.  
SU X. Preservation of the callus tissues under the condition of superlower temperature ( $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) in fritillaria thunbergii miq [J]. Chinese Journal of Modern Applied Pharmacy, 1990(4): 18-19.
- [44] KELLY R, ALBERT M, DE LADURANTAYE M, et al. RNA and DNA integrity remain stable in frozen tissue after long-term storage at cryogenic temperatures: a report from the Ontario Tumour Bank [J]. Biopreservation and Biobanking, 2019, 17(4): 282-287.
- [45] 黄友章, 沈建良, 尹文杰, 等. 骨髓细胞液氮长期冻存后间充质干细胞活力研究[J]. 中国输血杂志, 2010, 23(4): 272-276.  
HUANG Y Z, SHEN J L, YIN W J, et al. Viability of mesenchymal stem cells after long-term cryopreservation of bone marrow cells in liquid nitrogen[J]. Chinese Journal of Blood Transfusion, 2010, 23(4): 272-276.
- [46] 姚瑶, 王芬. 不同保存方式对生物大分子物质及微生物菌群的影响[J]. 中南大学学报(医学版), 2020, 45(8): 909-915.  
YAO Y, WANG F. Effects of different preservation methods on biomacromolecules and microbial flora [J]. Journal of Central South University (Medical Science), 2020, 45(8): 909-915.
- [47] ROWLEY S D, BYRNE D V. Low-temperature storage of bone marrow in nitrogen vapor-phase refrigerators: decreased temperature gradients with an aluminum racking system[J]. Transfusion, 1992, 32(8): 750-754.
- [48] 张雪莹, 朱承超. 自动化生物样本库建设与信息化管理[J]. 海军医学杂志, 2023, 44(4): 430-432.  
ZHANG X Y, ZHU C C. Construction and information management of automated bio-bank [J]. Journal of Navy Medicine, 2023, 44(4): 430-432.
- [49] 公茂琼, 郭浩, 刘加永, 等. 混合工质节流制冷技术及其在低温速冻冷藏方面应用研究进展[J]. 制冷与空调, 2015, 15(12): 62-66, 51.  
GONG M Q, GUO H, LIU J Y, et al. Research progress on mixed-gases Joule-Thomson refrigeration technology and its applications to freezing and cold storage at ultra-low temperature ranges[J]. Refrigeration and Air-conditioning, 2015, 15(12): 62-66, 51.
- [50] GONG M Q, WU J, CHENG Q, et al. Development of a  $-186\text{ }^{\circ}\text{C}$  cryogenic preservation chamber based on a dual mixed-gases Joule-Thomson refrigeration cycle [J]. Applied Thermal Engineering, 2012, 36: 188-192.
- [51] KO J, PARK J, KIM H-B, et al. Performance test of stirling cooler for ultra-low temperature application [J]. Journal of Power System Engineering, 2021, 25(6): 71-77.
- [52] 刘占杰. 斯特林深低温冰箱技术开发及应用[Z]. 青岛: 青岛海尔特种电器有限公司, 2017-10-20.  
LIU Z J. Development and application of stirling deep cryogenic refrigerator technology [Z]. Qingdao: Qingdao Haier Special Electric Appliance Co., Ltd, 2017-10-20.

## Research progress in refrigeration technology for cryogenic storage of biological samples

ZHANG Ankuo<sup>1</sup>, XIU Jijun<sup>1</sup>, WU Yixiao<sup>1</sup>, XIE Jing<sup>1,2,3,4</sup>

(1. College of Food Sciences and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. Shanghai Professional Technology Service Platform on Cold Chain Equipment Performance and Energy Saving Evaluation, Shanghai 201306, China; 3. Quality Supervision, Inspection and Testing Center for Cold Storage and Refrigeration Equipment, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Shanghai 201306, China; 4. National Experimental Teaching Demonstration Center for Food Science and Engineering(Shanghai Ocean University), Shanghai 201306, China)

**Abstract:** Low-temperature storage of biological samples has become an essential aspect of various fields, including biomedical research, clinical diagnosis, and pharmaceutical development. It involves the preservation of biological samples in a controlled environment to maintain their integrity, quality and functionality. The success of these applications relies heavily on the use of appropriate refrigeration technologies that can provide the necessary temperature and humidity conditions for long-term storage. Therefore, this article analyzes the low-temperature characteristics of biological samples, and combines domestic and foreign literature to review the current application status of refrigeration technology in biological sample storage from four temperature zones: cold storage, freezing, low-temperature, and ultra-low temperature. The advantages and disadvantages of various refrigeration technologies are compared, and the optimal refrigeration technology in the same temperature zone is summarized. Finally, the bottleneck problems of equipment that restrict low-temperature storage of biological samples are discussed and the future development direction of refrigeration technology for low-temperature storage of biological samples is proposed. Aiming to provide a certain reference for the development of refrigeration technology in the biomedical field.

**Key words:** low-temperature storage; temperature effects; refrigeration technology; cryogenic equipment