



全国高等医学院校实验教材



国家级医学基础实验教学示范中心系列教材

供基础医学、临床医学、预防医学、口腔医学等专业类用

组织工程学 实验教程

ZUZHIGONGCHENGXUE
SHIYANJIAOCHENG

主编/柏树令 顾晓松 张传森



人民军医出版社

PEOPLE'S MILITARY MEDICAL PRESS



江苏科技大学



江苏科技大学
Jiangsu University of Science and Technology



江苏科技大学
Jiangsu University of Science and Technology

组织工程学 实验教程

江苏科技大学
Jiangsu University of Science and Technology

主编：陈伟 副主编：陈伟 陈伟



江苏科技大学
Jiangsu University of Science and Technology

全国高等医学院校实验教材

国家级医学基础实验教学示范中心系列教材

供组织工程学、生物医学工程学、生物科学与生物技术类专业用

组织工程学实验教程

ZUZHIGONGCHENGXUE SHIYAN JIAOCHENG



人民军医出版社

PEOPLE'S MILITARY MEDICAL PRESS

北 京

图书在版编目(CIP)数据

组织工程学实验教程/柏树令,顾晓松,张传森主编. —北京:人民军医出版社,2010.3
ISBN 978-7-5091-3431-3

I. ①组… II. ①柏… ②顾… ③张… III. ①人体组织学—实验—医学院校—教材
IV. ①R329-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2010)第 006829 号

策划编辑:徐卓立 文字编辑:王 方 责任审读:黄栩兵
出 版 人:齐学进
出版发行:人民军医出版社 经销:新华书店
通信地址:北京市 100036 信箱 188 分箱 邮编:100036
质量反馈电话:(010)51927290;(010)51927283
邮购电话:(010)51927252
策划编辑电话:(010)51927300—8743
网 址:[www. pmmp. com. cn](http://www.pmmp.com.cn)

印、装:北京国马印刷厂
开本:787mm×1092mm 1/16
印张:11.5 字数:274 千字
版、印次:2010 年 3 月第 1 版第 1 次印刷
印数:0001~3000
定价:36.00 元

版权所有 侵权必究
购买本社图书,凡有缺、倒、脱页者,本社负责调换

内 容 提 要

组织工程学是目前生命科学与工程学相结合的热点学科。本书是《组织工程学教程》的配套用书,也是医学、生物学、工程学等相关专业掌握该学科的实验指导用书。全书分7章,对相关的实验室组建、实验项目和常用仪器设备做了介绍,实验项目包括基本实验、综合性实验和创新设计性实验三类,其中介绍种子细胞的培养、诱导分化及鉴定,种子细胞实验技术及应用,常用支架材料制备的实验共43项,常用基本实验技术14项,还有5类组织工程化器官的构建方法,并配有相关实验所用的主要大型仪器设备照片及其功能的简要描述,附有中英文索引。本书方便实用,可供组织工程学、生物医学工程学、生物科学与生物技术类专业的本科生使用,还可成为医学类和工程学类硕士与博士研究生的选修课程教材及研究生指导教师的参考用书。

国家级医学基础实验教学示范中心

医学基础系列实验教材

出版说明

进入 21 世纪,科学技术的发展瞬息万变,信息高速公路的运转使人才培养工作进入了一个知识爆炸的全新时代,国际科学技术知识大循环带来了又一次科学革命,形成了不可阻挡的潮流。新的时代需求新型人才,创新科学技术产生需要新的人才培养模式,新型师资队伍建设和国际先进水平接轨的现代化科学方法熏陶学生。

医学实验学教学改革工作在教育部的领导下已在我国全面铺开,为了培养多用型、综合型人才,国家实施了精品教育工程计划,建立国家级医学实验示范中心是举措之一。正是在这一宏观教育改革精神的指导下,中国医科大学的基础医学被评为“国家级医学基础实验教学示范中心”。从此,医学基础实验课的考试分数与理论课平分天下,各占据半壁江山。

教材是教学的载体,迄今为止我国还没有一套国家规划的专门的医学基础学科实验教材供学生使用,这严重影响了国家教育改革措施的落实。由于中国医科大学是“三基三严”的发祥地,医学基础教育改革在 CMB 课题支撑下引领风骚,医学基础师资底蕴丰厚,因此,从 2008 年起我校示范中心联合其他兄弟院校组织了一系列医学基础课实验学教材的编写。本套实验教材目前陆续出版的有:

- 《人体机能学实验教程》 冯甲棣等主编
- 《医学生物学实验教程》 赵彦艳等主编
- 《组织工程学实验教程》 柏树令等主编
- 《生物医学工程实验教程》 沙宪政等主编
- 《生物医学信息管理学实验教程》 沙宪政等主编
- 《医学实验仪器检测学实验教程》 崔泽实等主编
- 《人体形态科学实验教程》 吕永利等主编
- 《解剖学实验教程》 吕永利等主编
- 《病原生物学实验教程》 罗恩杰等主编

这些教材的编写均是实验教学领域中新的尝试,主要为了适应迅速发展的医学实验教学与人才培养的需要,也是为提高我国的医学教育质量,推动我国医学教育的发展应尽的一份努力,应献的一份爱心。在此,欢迎兄弟院校多给我们提出宝贵意见。

中国医科大学
2009 年 11 月

前 言

《组织工程学实验教程》定位于培养组织工程学、生物医学工程学、生物科学与生物技术等专业五年制本科生,并为医学类和医学工程学类的硕士与博士研究生提供选修课程及研究生指导教师的参考书。本教程旨在为培养质量更高、数量更多、知识更新的科学知识复合型学生服务,为将来占领国际组织工程制高点输送人才。

在科学知识爆炸的时代,根据信息技术与信息高速公路迅速发展时期的特点,培养创新型人才是落实科学发展观的关键。如何激发学生头脑创新灵感的火花,产生创新思维是创新工作的首要任务;如何将创新思维运作的构想经过实验技术的协助使之付诸于实践,产生创新物质,转变为经济与社会效益并服务社会是当前国家的需要,教学中努力做到这些是实现科学技术生产力的具体体现。

组织工程学是一门边缘学科,是国际科学最前沿的学科之一。其宗旨是制造人体组织与器官替代物,用以修复疾病创伤所致的器官缺损,以恢复其基本结构与形态,恢复其正常生理功能,恢复劳动能力,达到治疗疾病的目的。组织工程学真正兴起至今不足 20 年,我国的一批专家教授为中国组织工程学走向世界建立了丰碑,使我国与国际先进水平的差距较小。由于近年来我国科学技术发展迅猛,组织工程的教学与研究工作日新月异,加之我国人口众多,对器官移植需求的呼声越来越高,成为组织工程器官再造的强大动力,也成为我国组织工程学科发展的促进剂和催化剂。

本教材编写凝聚了中国医科大学组织工程研究所、第二军医大学、清华大学、南通大学、辽宁医学院和延边大学等院校从事组织工程器官实验研究与教学工作的专业人员的汗水与心血,是集体智慧的结晶。全书包括基本实验、综合性实验和创新设计性实验三类,共 7 章 37 节内容,对相关的实验室组建、实验项目做了介绍,还配备了相关实验所用的主要大型仪器设备照片及其功能的简要描述,书末附中英文索引,以方便使用者参考。

由于组织工程学涉及面广、内容博大精深、发展瞬息万变,而且这是国内第一本用于培养本科生的组织工程学实验教程,可能有不足之处请使用者不吝赐教,以便再版时更臻完善。

柏树令

2010 年 1 月

目 录

第1章 组织工程实验室的组建	(1)
第一节 细胞培养室的设计与分级	(1)
一、细胞培养前的实验室设计	(1)
二、洁净室	(2)
第二节 细胞培养室的规章制度	(6)
第2章 种子细胞的培养、诱导分化及鉴定实验	(7)
第一节 体外组织细胞培养概述	(7)
一、体外培养环境的建立及仪器设备	(7)
二、体外培养的基本原理、生存条件与培养用液	(8)
三、细胞培养基本操作技术	(10)
第二节 组织工程种子细胞的分离培养及鉴定	(14)
一、小鼠胚胎干细胞的分离培养	(15)
二、大鼠骨髓间充质干细胞的分离和培养	(18)
三、大鼠骨髓间充质干细胞的换液、传代及活力测定	(20)
四、大鼠成骨细胞的分离培养及鉴定	(23)
五、大鼠破骨细胞的分离培养及鉴定	(25)
六、大鼠胰岛细胞的分离、纯化及鉴定	(27)
七、大鼠脂肪干细胞的分离培养及鉴定	(31)
八、大鼠毛囊干细胞的分离培养及鉴定	(33)
九、大鼠神经干细胞的分离培养及鉴定	(34)
十、兔外周血内皮祖细胞的分离培养及鉴定	(36)
十一、人胎盘来源的间充质干细胞的分离培养及鉴定	(38)
十二、人脐静脉内皮细胞的分离培养及鉴定	(39)
十三、人脐动脉平滑肌细胞的分离培养及鉴定	(41)
第三节 组织工程种子细胞的诱导分化及鉴定	(43)
一、大鼠骨髓间充质干细胞向成骨样细胞的诱导分化及鉴定	(43)
二、大鼠脂肪干细胞向成骨细胞的诱导分化及鉴定	(46)

三、大鼠脂肪干细胞向软骨细胞的诱导分化及鉴定	(48)
四、大鼠脂肪干细胞向内皮细胞的诱导分化及鉴定	(51)
五、大鼠脂肪干细胞向脂肪细胞的诱导分化及鉴定	(53)
六、兔脂肪干细胞向成软骨细胞的诱导分化及鉴定	(56)
七、兔心肌样细胞的诱导和分化	(61)
第3章 组织工程种子细胞实验技术及应用	(63)
第一节 细胞的标记与识别	(63)
一、增强绿色荧光蛋白报告基因的转染标记	(63)
二、 β -半乳糖苷酶基因转染标记	(65)
三、用 Hoechst 33342 进行细胞核染色	(66)
四、用 5 溴-2 脱氧尿苷标记正在分裂的细胞	(67)
五、DAPI 染色标记示踪技术	(68)
六、AAV-EGFP 转染大鼠骨髓间充质干细胞及转染后的检测	(69)
七、pEGFP- <i>Bmp-2</i> 载体转染大鼠骨髓间充质干细胞的定位和表达	(71)
第二节 细胞的基因改造与修饰	(74)
一、基因插入技术	(74)
二、基因敲除技术	(76)
三、基因定点突变技术	(79)
四、RNA 干扰技术	(83)
第三节 细胞治疗	(86)
一、细胞治疗的概念	(86)
二、细胞治疗的意义	(87)
三、骨髓间充质干细胞移植对大鼠脑缺血的修复和治疗	(87)
第4章 组织工程常用支架材料的制备	(90)
第一节 天然组织工程支架的制备	(90)
一、天然组织工程骨支架的制备	(90)
二、天然组织工程神经支架的制备	(92)
三、天然组织工程血管支架的制备	(95)
四、天然组织工程壳聚糖支架材料的制备	(97)
五、天然组织工程丝素蛋白支架材料的制备及孔隙率测定	(98)
六、一种多通道壳聚糖神经组织工程支架的制备	(99)
七、以编织法为基础制备壳聚糖神经修复导管	(103)
八、猪小肠黏膜下层的制备及形态学检测	(106)
第二节 人工合成组织工程支架的制备	(109)
一、可降解葡萄糖聚酯的合成	(109)
二、相分离法制备具单一方向微管结构的 PHBHHX 组织工程支架	(112)
第5章 组织工程化器官的构建	(115)
第一节 骨髓间充质干细胞复合珊瑚羟基磷灰石支架构建组织工程骨	(115)
第二节 骨髓间充质干细胞复合生物活性陶瓷构建组织工程骨	(116)

第三节	骨髓间充质干细胞复合脱细胞真皮基质构建组织工程皮肤	(117)
第四节	内皮祖细胞性组织工程化带瓣静脉的构建	(119)
第五节	组织工程心瓣膜的体外制备	(121)
第 6 章	组织工程常用的实验技术	(123)
第一节	石蜡切片及 HE 染色	(123)
第二节	免疫组织化学染色	(126)
第三节	SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳	(130)
第四节	RT-PCR	(132)
第五节	应用实时定量 PCR 检测细胞基因转录水平	(135)
第六节	组织工程骨膜体内植入技术	(137)
第七节	硬组织切片技术在组织工程骨研究中的应用	(139)
第八节	骨脱细胞后的有机成分分析	(141)
第九节	细胞的冻存与复苏	(142)
第十节	质粒 DNA 的提取纯化、限制性酶切及电泳检测	(145)
第十一节	DNA 的重组连接	(149)
第十二节	感受态细胞的制备及质粒的转化	(150)
第十三节	真核细胞转染	(152)
第十四节	真核表达载体 pEGFP- <i>Bmp2</i> 的构建	(154)
第 7 章	组织工程常用仪器设备的使用	(158)
第一节	超净工作台	(158)
第二节	倒置显微镜	(159)
第三节	CO ₂ 培养箱	(160)
第四节	BIO-rad 垂直电泳槽	(162)
第五节	离心机	(163)
第六节	冷冻切片与恒冷箱切片机	(164)
第七节	生物反应器	(166)
第八节	激光共聚焦显微镜	(167)
附录 A	中英文词汇及缩略语索引	(170)

组织工程器官的研制过程包括两大部分:一部分是在体外分离培养相应组织的功能细胞与模拟机体组织结构的细胞外基质——支架材料体外复合培养,在培养容器中构建活的工程化组织;另一部分是植入动物或人体内,修复组织缺损,替代组织或器官的一部分或全部功能。因此,种子细胞的研究是组织工程众多研究领域中最基础,也是最重要的环节之一。

组织工程学研究的大量工作在于细胞培养。细胞培养室的建立和完善是保证细胞培养工作顺利进行的基础,了解细胞培养室及其相关实验室的设计和要求,学习一些基本的规章制度是完成培养工作的前提条件。

第一节 细胞培养室的设计与分级

一、细胞培养前的实验室设计

在进行细胞培养工作之前,应首先对工作中所需要的最基本的设备、条件有全面的了解,以便因地制宜地利用现有房屋新建或改建成实验室。实验室的大小取决于工作的目的和规模,实验室的位置安排应按细胞培养程序来设计,避免某些环节颠倒,引起日后工作混乱。

细胞培养必须严格在无菌的条件下进行。细胞培养室的设计原则是防止微生物污染和有害因素影响,要求工作环境清洁、空气清新、干燥和无尘。细胞培养前的相关实验室包括实验准备室、洗涤灭菌室、培养室(无菌操作室)和其他小型仪器设备室等。

1. 实验准备室 完成所使用的各种药品及培养液的称量、溶解、配制、分装及贮备等。

主要设备:药品柜、防尘橱(放置培养容器)、通风橱(配制有毒的挥发性药品)、冰箱、天平、纯水机、酸度计及常用的培养基配制用玻璃器皿等。

2. 洗涤灭菌室 完成各种器具的洗涤、干燥、保存和消毒等。

主要设备:水池、操作台、高压灭菌锅、干燥灭菌器(如烘箱)等。

3. 培养室(无菌操作室) 主要用于各种支架材料的消毒、细胞的原代分离和接种、传代培养、培养物的转移、培养物生长情况的观察以及一切需要进行无菌操作的技术程序。无菌操作室应与外界隔离,不能穿行或受其他干扰。理想的无菌操作室应分为三部分(从外向内)。

(1)更衣间:供更换衣服、鞋子及穿戴帽子和口罩。进入无菌操作室前在此更衣换鞋,以减少进出时带入细菌。

(2)缓冲间:位于更衣间与操作间之间,目的是为了保证操作间的无菌环境,同时可放置恒

温培养箱及某些必需的小型仪器。应该安装紫外线灭菌灯,用以照射灭菌。缓冲间可放置电冰箱、冷藏器及消毒好的无菌物品等。

(3) 无菌操作间:专用于无菌操作和细胞培养,其大小要适当,顶部不宜过高(不超过 2.5m),以保证紫外线的有效灭菌效果。墙壁光滑无死角以便清洁和消毒。工作台安置不应靠墙壁,台面要光滑、压塑作表面,漆成白色或灰色以利于解剖组织及酚红显示酸碱度的观察。无菌操作间要求干爽安静、清洁明亮。在适当位置吊装 1 或 2 盏紫外线灭菌灯,以照射灭菌。有条件应安装一小型空调,使室温可控,这样可使门窗紧闭,减少与外界空气对流。更衣间、缓冲间和无菌操作间之间要设置拉动门,以减少开关门时的空气流动。

无菌操作间的空气消毒一般采用紫外线灯照射的方式,但这会产生臭氧,并使室内温度及湿度均较高,不利于工作人员健康,最好用空气过滤的恒温恒湿装置。

主要设备:紫外光源、超净工作台、二氧化碳培养箱、离心机、倒置显微镜、水浴锅、消毒器、酒精灯、接种器械(接种镊子、剪刀、解剖刀、接种针)、定时钟等。

4. 其他小型仪器设备室 血细胞计数器、移液枪、过滤灭菌器、电炉等加热器具、匀浆机、磁力搅拌器、低速台式离心机等。

二、洁 净 室

(一)基本概念及构成

洁净室(clean room),亦称为无尘室或清净室。它是污染控制的基础,是指将一定空间范围内空气中的微粒子、有害气体、细菌等污染物排除,并将室内的温度、洁净度、室内压力、气流速度与气流分布、噪声振动、照明、静电等控制在某一要求范围内。因而需要经过特殊设计的房间,做到不论外界空气条件如何变化,室内均能维持原先设定的洁净度、温湿度及压力等。

洁净室由下列系统组成,缺一不可,否则将无法构成完善优质的洁净室:①天花板系统,包括吊杆、钢梁、天花板格子梁;②空调系统,包括空气舱、过滤器系统、风车等;③隔墙板,包括窗户、门;④地板,包括高架地板或防静电舒适地板;⑤照明器具,包括日光灯、紫外灯等。

洁净室的建筑主体构造,一般是用钢筋或骨水泥,但无论是何种构造,必须满足以下条件:①不会因温度变化或振动而发生裂痕;②吸湿性小;③不易产生微尘粒子,且很难附着粒子;④热绝缘性高,以维持室内的湿度条件。

(二)洁净度标准

1963 年,美国发行了洁净室联邦标准 Fed Std 209。在该标准中,将洁净室按环境中 1ft^3 ($1\text{ft}^3 = 0.028\text{ m}^3$) 空间内直径 $\geq 0.5\mu\text{m}$ 的粉尘最大数量限度分成若干级别,如 100 级、10 000 级、100 000 级。中国过去的洁净室标准也是按这种方法分级的。

1999 年,国际标准化组织 ISO 颁布了洁净室国际标准 ISO14644-1《洁净室与受控洁净环境,第一部分:空气洁净度分级》。ISO 规定的洁净度等级及传统分级的具体数值,见表 1-1。

电子行业和制药行业是与洁净室关系最密切的两个行业。ISO 标准一出现,电子行业就立即采用了这一新标准,而制药业仍沿用老的洁净级标准规定。1998 年版的 GMP(GMP 是国际上对《药品生产质量管理规范》的通称)规范中比前 1 版增加了一个 300 000 级(表 1-2)。

表 1-1 ISO 14644-1 空气洁净度分级

ISO14644-1 分级	最高浓度极限(颗粒数/m ³)						近似对应 传统规格
	0.1 μ m	0.2 μ m	0.3 μ m	0.5 μ m	1.0 μ m	5.0 μ m	
ISO 1 级	10	2	—	—	—	—	—
ISO 2 级	100	24	10	4	—	—	—
ISO 3 级	1 000	237	102	35	8	—	1 级
ISO 4 级	10 000	2 370	1 020	352	83	—	10 级
ISO 5 级	100 000	23 700	10 200	3 520	832	29	100 级
ISO 6 级	1 000 000	237 000	102 000	35 200	8 320	293	1 000 级
ISO 7 级	—	—	—	352 000	83 200	2 930	10 000 级
ISO 8 级	—	—	—	3 520 000	832 000	29 300	100 000 级
ISO 9 级	—	—	—	35 200 000	8 320 000	293 000	—

表 1-2 GMP 规定的洁净度

洁净级别	尘粒最大允许数(个/m ³)		微生物最大允许数		相当于 ISO 分级
	$\geq 0.5\mu$ m	$\geq 5\mu$ m	浮游菌(个/m ³)	沉降菌(个/皿)	
100 级	3 500	0	5	1	ISO 5 级
10 000 级	350 000	2 000	100	3	ISO 7 级
100 000 级	3 500 000	20 000	500	10	ISO 8 级
300 000 级	10 000 000	60 000	—	15	—

从表 1-2 可以看出,100 级洁净区标准(按尘粒数目和微生物数目来定义的)是指,1m³ 尘粒最大允许数, $\geq 0.5\mu$ m 的粒子数不得超过 3 500 个, $\geq 5\mu$ m 的粒子数为 0 个;微生物最大允许数,浮游菌数不得超过 5 个/m³,沉降菌数不得超过 1 个/培养皿。同理,随级别增加,对每立方米尘粒和微生物的数量要求适当放宽,而洁净度降低。

除此之外,不同的洁净度级别对气流的要求也不同。如 1~100 级洁净室均采用单向流动的气流组织送风方式,即洁净室内的气流在同一截面的任一点,气流的方向和速度均保持一致,这样可以使洁净室气流像“活塞”一样,将室内的尘埃粒子以最快的速度带走。要实现“活塞”效果,高效过滤器需要满布屋顶才可以实现单向流的气流组织方向。1 000~100 000 级洁净室的气流组织方向和 100 级以上的洁净室不同,室内气流是以不均匀的速度呈不平行流动,伴有回流或涡流,主要靠洁净的气流不断稀释室内空气,将室内的污染逐渐排出,实现空气的净化。

不同的净化等级,主要是依靠单位时间内所送风量的不同来表现的。洁净室必须维持一定的相对正压,不同等级的洁净室之间的压强 ≥ 5 Pa;洁净区与非洁净区之间的压强应 ≥ 10 Pa,以防止低级洁净室空气逆流到高级洁净室。洁净室的温度宜保持在 18~26℃,相对湿度为 45%~65%。

一般来说,1 级洁净室主要用于制造大规模集成电路的微电子工业;10 级洁净室主要用于带宽 $<2\mu$ m 的半导体行业;100 级是最常用的洁净室,可用于医药中的无菌制造工艺、外科手术、人造内脏器官和集成电路生产;1 000 级主要用于光学产品和高质量微型轴承的生产,以及飞机陀螺仪的测试;10 000 级用于液压设备或气压设备的生产,有些情况下也用于食品饮

料的生产;100 000 级用于很多工业生产部门,食品饮料和医药行业也常使用这一级别洁净室。

为保持洁净室的洁净度,进出的人员有一定的穿着规定,10 000 与 100 000 级,必须穿长袖无尘衣、无尘鞋,戴帽子与面罩;1 000 级(含)以上,需穿特殊的洁净连身衣、无尘鞋将全身裹住,并戴上手套和面罩。

(三)影响洁净度的因素

洁净室的洁净度容易受到气流的影响,也就是说,人、机器、建筑结构等所产生的尘埃移动、扩散都会受到气流的支配。洁净室是利用高效空气微粒滤层(high efficiency particulate air filter, HEPA)、超高效空气过滤器(ultra low penetration air filter, ULPA)过滤空气,其尘埃的收集率可达 99.97%~99.999 95%,因此经过此过滤器滤过的空气应该十分干净。然而洁净室内除了人以外,尚有机器等发尘源,这些发生的尘埃一旦扩散,将无法保持空间洁净,因此必须利用气流将发生的尘埃迅速排出室外。

影响洁净室气流的因素很多,如制程设备、人员、洁净室的组装材料、照明器具及生产设备上方气流的分流点等。一方面,一般洁净室的气流速度是 0.25~0.50m/s,此速度属微风区域,易受人或机器等的动作干扰而混乱,可提高风速来抑制此混乱,但又会增加运转成本,所以应在满足要求的洁净度标准时,以最适当的风速供应。另一方面,均一气流也是保持洁净室洁净度稳定的一个重要因素。风速有异,均一气流无法保持,气流会沿着壁面发生涡流作用,此时很难实现高洁净度。洁净室内的桌椅等障碍物,容易在相接处产生涡流,其附近区域的洁净度会较差,因此在工作桌面钻上回风孔,将使涡流现象减少到最低;组装材料的选择是否恰当、设备布局是否完善,也是气流是否成为涡流的重要因素。

(四)分类

按用途洁净室可分为两大类:一类是工业洁净室,以控制无生命的微粒为对象,内部一般保持正压状态,主要用于精密机械工业、电子工业(半导体、集成电路等)、宇航工业和高纯度化学工业等多种行业;另一类是生物洁净室,主要控制有生命微粒(细菌)与无生命微粒(尘埃)对工作对象的污染。生物洁净室又可分为:①一般生物洁净室,主要控制微生物(细菌)造成的污染,要求其内部材料能经受各种灭菌剂的处理,内部一般保持正压,主要用于制药工业、医院(手术室、无菌病房)、食品、化妆品、饮料生产、动物实验室、理化检验室和血站等;②生物学安全洁净室,主要控制对象为对外界和人造成污染的有生命微粒,其内部要保持负压,多用于细菌学、生物学、洁净实验室、重组基因和疫苗制备等。

(五)污染源

洁净室的污染源主要来自有生命的微生物和无生命的尘埃,由工作人员产生的污染占 90%以上。

1. 人每分钟脱落 1 000 片皮肤(平均大小为 $30\mu\text{m}\times 60\mu\text{m}\times 3\mu\text{m}$)。
2. 人的头发(直径为 $50\sim 100\mu\text{m}$)每天脱落 30~50 根。
3. 口水包含各种钠、钾、盐、酶、氯化物及食品微粒等。
4. 日常衣物含有微粒、纤维、硅土、纤维素、各种化学品和细菌。
5. 人在静止和坐立时每分钟将产生 10 000 个 $>0.3\mu\text{m}$ 的微粒。
6. 人在头部和躯干做动作时每分钟将产生 1 000 000 个 $>0.3\mu\text{m}$ 的微粒。
7. 人在以 0.9m/s 的速度行走时每分钟将产生 5 000 000 个 $>0.3\mu\text{m}$ 的微粒。

8. 人咳嗽一次发菌量为 70~700 个/min,打喷嚏一次一般为 4 000~62 000 个/min。

9. 人穿平常衣服时发菌量为 3 300~62 000 个/min。而穿无菌服时,静止时的发菌量一般为 10~300 个/min,躯体一般活动时发菌量为 150~1 000 个/min,快步行走时的发菌量为 900~2 500 个/min。

10. 有口罩与无口罩发菌量之比为 1:7~1:14。

11. 人的发尘量还与服装材料、样式、活动与否、清洗与否有关。棉质发尘量最大,其次为的确良、去静电涤纶纶和尼龙;大褂式发尘量最大,上下分装型次之,全罩型最少;活动时的发尘量一般是静止时的 3~7 倍;用溶剂洗涤过的发尘量是用一般水清洗的 1/5。

洁净室内各种设施及维护结构的发尘量一般占 10% 左右,以地面为例,大约 8m² 地面的表面发尘量与一个静止的人的发尘量相当。

(六) 消毒与灭菌

消毒与灭菌两者的概念不同。灭菌是指杀死或去除物质中的全部微生物(包括细菌、病毒等),具有绝对的意义,即与灭菌对应的就是未灭菌,不存在灭菌多少的中间状态,因此,绝对的灭菌由于很难达到或者无法达到无限长的时间而几乎不存在。消毒是指杀死大多数病原微生物或者使之减少到一定程度的处理方式,在这个过程中有一部分细菌或者病毒由于对热力或者药力的抗性而不被破坏,具有相对的意义,即消毒药本身具有一定的灭菌范围。

常用的灭菌方法有:高温干燥灭菌、高压蒸汽灭菌、过滤灭菌和气体灭菌等。常用的消毒方法有:煮沸和常压蒸汽消毒、紫外线照射消毒、低温消毒、药剂消毒等。

紫外线消毒是洁净室最常用的消毒方式。紫外线的穿透能力非常弱,主要靠电离产生氧自由基来消毒。细胞培养室里面一些不能照射紫外线的物品可以用一般的材料(如玻璃和有机玻璃)盖住。紫外灯可以通过安装吊灯、侧灯或顶灯的方式来进行。一般认为,环境温度在 20℃、相对湿度为 40%~60% 的条件下,紫外灯的灭菌效果最好。紫外线对不同菌种的杀菌作用也不同。如果把照射时间与照射强度的乘积定为照射剂量,当杀死大肠杆菌所需剂量为 1 时,杀死葡萄球菌、结核杆菌之类则需 1~3,枯草菌及其芽胞及酵母菌之类则需 4~8,而霉菌类则需 2~50。由于紫外线灭菌效果有一定的局限性以及灭菌时可能导致对人体的破坏性,利用紫外灯对生物洁净室进行全面灭菌已较少使用,只有在个别区域如更衣室、洗手间等有所应用。目前紫外线灭菌常用的是与空调系统相结合的气相循环消毒方式。

甲醛熏蒸消毒是药剂消毒的方法之一,也是目前生物洁净室常用的一种消毒方式。甲醛消毒有两种形式。一种是局部消毒,只对洁净室的局部空间进行小范围的消毒。可将甲醛直接在室内蒸发(或加热蒸发),室内温度最好在 20℃ 以上,作用时间 12~24h,熏蒸消毒时应密闭门窗。消毒后一般多用自然通风驱散甲醛气体,需时较长,若急于排出气体,可将 25% 氨水加热蒸发中和。氨水用量为所用甲醛水溶液的一半,中和时间为 30min。另一种是与空调系统结合。甲醛从带有夹套的消毒罐内溢出,进入空调机组的送风总管,然后送入洁净室内。甲醛在 70℃ 以上极易蒸发,其与空调系统的结合使用可通过开、关阀门来实现。甲醛气体毒性非常强,所以操作时一定要戴上防毒面具。开始消毒后要马上离开灭菌室,并关上门。

在甲醛灭菌前,先用苯扎溴铵擦洗整个墙面。此外,平时地板灭菌也可以使用。苯扎溴铵和乙醇相比,最大的优点是便宜,因为苯扎溴铵 500ml 只需 5 元,而且可以稀释 50 倍用;而同样量的乙醇价格可能是苯扎溴铵的几十倍。

第二节 细胞培养室的规章制度

细胞培养室的实验对象是离体组织和体外细胞,对致病微生物及病毒无抵抗性,有被污染的危险性,因此,进入实验室必须提高警惕,严格遵守下列规章制度。目的在于规范细胞培养室的使用方式和维护措施,以确保发挥细胞培养室的最大效益和保障培养室的正常运转以及防止污染。

1. 细胞培养室正常开放时间为 8:00~20:00,若加班可与当天值日生协调,周六、日使用者必须在周五预约登记。

2. 根据需要,按预约制度使用细胞培养室,实验用品尽量一次带人,确保实验顺利完成。

3. 任何人员不得将无关人员带入细胞培养室,外来人员未经细胞培养室主管教师允许不得进入细胞培养室。

4. 凡进入细胞培养室的人员要有严格的无菌操作观念,进门要换鞋,要穿戴好工作服、帽子、口罩、手套,不必需的物品勿携入室内,进出细胞培养室各操作间要随手关门。

5. 使用前打开超净工作台、紫外灯和风机,同时打开室内紫外灯照射 30min 以上。

6. 使用仪器前认真阅读操作规程,并严格按操作规程进行操作,未经管理者同意不得擅自更改仪器程序。用后将仪器恢复原位,并填写使用情况记录。如仪器出现故障,应及时通知实验室老师。

7. 操作时严格按无菌操作程序进行,否则造成他人的细胞损失,酌情赔偿。

8. 未经允许,不得擅动其他实验者的细胞。

9. 实验室内应保持安静和良好秩序,实验时要严肃认真。不得在细胞培养室内聊天、大声喧哗、不得在细胞培养室做任何与实验无关的事情。值日生负责细胞培养室的卫生和监督。

10. 实验室内严禁吸烟和饮食。

11. 每次实验结束后,及时清理桌面、台面、地面,整理好用过的实验器材,将自己的物品放回到指定地点,不要随便堆放;关闭水浴箱、离心机、显微镜等;将实验不需要的细胞及时清理出培养箱;如实登记使用人、使用时间、使用内容、使用情况及有无异常情况;用酒精棉球擦拭工作台面,并打开紫外灯照射 30min,观察培养箱内 CO_2 的浓度,待正常后方可离开,并将废弃物品带出操作间。

12. 离开实验室前,脱去工作服和拖鞋,关好水、电、门、窗,方可离开实验室。如有害材料或试剂污染桌、凳、地面、书或衣物等,应报告管理人员,并及时洗净。

13. 细胞培养室内每周用苯扎溴铵加紫外线消毒 1 或 2 次,每隔两周彻底清理并消毒 1 次。

14. 值日生应及时给培养箱更换灭菌的蒸馏水,检查培养箱的供气情况,如发现钢瓶内气体压力不足应及时通知主管教师。

15. 加强细胞培养室的防火和防盗意识,室内物品一律不外借。

16. 每天最后一位离开的人员(一般为值日生)必须全面检查细胞培养室的仪器、门、电、空调等,确保关好,并完成细胞培养室的卫生整理工作,并在登记本上签字核实。

(田晓红 贾长青)

在组织工程研究中,获得足够数量、不引起免疫排斥反应且具有再生活力的种子细胞,以及在体外大量培养、扩增、诱导分化、改造修饰种子细胞的工作是开展研究的前提和基础。因为种子细胞是组织工程中用于修复或重建新生组织的最基本原始材料,也是组织工程化组织成功构建的基本因素。

第一节 体外组织细胞培养概述

体外组织及细胞培养工作始于 20 世纪初,现已广泛应用于生物学、医学各个领域,并成为重要的基础学科之一。体外培养是指从动物或人体内取出组织或细胞,在体外模拟体内生理微环境的特定条件下,进行孵育培养,使组织或细胞生存并生长、分化和增殖。按照体外培养的结构成分,可将体外培养人为地分为组织培养(tissue culture)、细胞培养(cell culture)及器官培养(organ culture)等类别。

一、体外培养环境的建立及仪器设备

细胞培养室是提供与细胞、组织和器官研究相关学科进行体外培养的基础设施。详见第 1 章第一节。

1. 细胞培养实验室的基本设备

(1) 无菌设备:超净工作台、紫外灯、酒精灯、消毒酒精喷壶、电热干燥箱、除菌滤器、高压灭菌器、高效过滤器。

(2) 细胞生长相关设备:CO₂培养箱(提供 37℃±0.5℃恒温、5%CO₂、95%空气),纯水仪、培养板、培养瓶、培养皿、培养基、血清。

(3) 细胞检测仪器:倒置显微镜、荧光显微镜、照相机、酶标仪、微孔板振荡器、高速离心机、移液器。

(4) 细胞保存设备: -80℃冰箱、液氮罐。

2. 无菌操作实验室的要求

(1) 与缓冲间相连,缓冲间内备消毒过的服装和鞋、口罩、帽子、手套等,入内换上。

(2) 设置 1 或 2 台超净工作台,工作前紫外灯照射消毒 30~60min。

(3) 室内空气不流通、清洁、干燥。

(4) 侧边设传递窗,用于物品传递。