



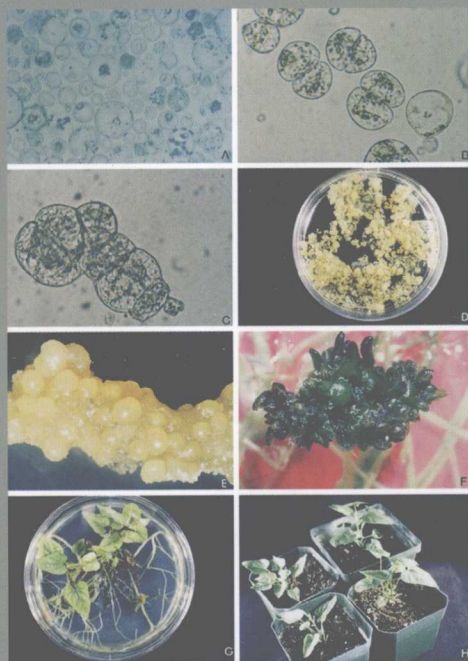
面向 21 世纪 课 程 教 材
Textbook Series for 21st Century



全国高等农林院校“十一五”规划教材

细胞工程实验教程

王 蒂 主编



 中国农业出版社

面向 21 世纪课程教材

Textbook Series for 21st Century

全国高等农林院校“十一五”规划教材

细胞工程实验教程

王 蒂 主编

- [1] 曹文义, 刘国民主编. 实用植物组织培养技术教程 (修订本). 兰州: 甘肃科学技术出版社, 1998
- [2] 王蒂主编. 细胞工程实验教程. 北京: 中国农业出版社, 1998
- [3] 王蒂主编. 细胞工程实验教程. 北京: 中国农业出版社, 1998
- [4] 王蒂主编. 细胞工程实验教程. 北京: 中国农业出版社, 1998
- [5] 王蒂主编. 细胞工程实验教程. 北京: 中国农业出版社, 1998
- [6] 王蒂主编. 细胞工程实验教程. 北京: 中国农业出版社, 1998
- [7] 王蒂主编. 细胞工程实验教程. 北京: 中国农业出版社, 1998
- [8] 王蒂主编. 细胞工程实验教程. 北京: 中国农业出版社, 1998
- [9] 王蒂主编. 细胞工程实验教程. 北京: 中国农业出版社, 1998
- [10] 王蒂主编. 细胞工程实验教程. 北京: 中国农业出版社, 1998
- [11] 王蒂主编. 细胞工程实验教程. 北京: 中国农业出版社, 1998
- [12] 王蒂主编. 细胞工程实验教程. 北京: 中国农业出版社, 1998
- [13] 王蒂主编. 细胞工程实验教程. 北京: 中国农业出版社, 1998
- [14] 王蒂主编. 细胞工程实验教程. 北京: 中国农业出版社, 1998
- [15] 王蒂主编. 细胞工程实验教程. 北京: 中国农业出版社, 1998
- [16] 王蒂主编. 细胞工程实验教程. 北京: 中国农业出版社, 1998
- [17] 王蒂主编. 细胞工程实验教程. 北京: 中国农业出版社, 1998
- [18] 王蒂主编. 细胞工程实验教程. 北京: 中国农业出版社, 1998
- [19] 王蒂主编. 细胞工程实验教程. 北京: 中国农业出版社, 1998
- [20] 王蒂主编. 细胞工程实验教程. 北京: 中国农业出版社, 1998
- [21] 王蒂主编. 细胞工程实验教程. 北京: 中国农业出版社, 1998
- [22] 王蒂主编. 细胞工程实验教程. 北京: 中国农业出版社, 1998
- [23] 王蒂主编. 细胞工程实验教程. 北京: 中国农业出版社, 1998
- [24] 王蒂主编. 细胞工程实验教程. 北京: 中国农业出版社, 1998

中国农业出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

细胞工程实验教程/王蒂主编. —北京: 中国农业出版

社, 2007. 7

全国高等农林院校“十一五”规划教材. 面向 21 世纪
课程教材

ISBN 978 - 7 - 109 - 11637 - 5

I. 细… II. 王… III. 细胞工程—实验—高等学校—教
材 IV. Q813 - 33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2007) 第 065741 号

细胞分离和培养、原生质体培养和融合、组织培养和器官培养、植物基因转化等 23 个实验。动物细胞工程实验包括常用液体的配制、精子和卵母细胞的采集与观察、小鼠胎儿成纤维细胞原代培养和传代培养、体外培养细胞生长曲线测定和染色体分析、动物细胞融合、家兔和羊超数排卵及胚胎移植、小鼠胚胎体外培养、小鼠胚胎干细胞分离与克隆培养、转基因细胞的制备等 23 个实验。

细胞工程主要是对植物和动物的组织和细胞进行离体操作的一门实验性课程。

中国农业出版社出版

(北京市朝阳区农展馆北路 2 号)

本专科生及研究生的细胞工程 (邮政编码 100026) 供相

关专业教师 and 科研人员参考。责任编辑 李国忠

中国农业出版社印刷厂印刷 新华书店北京发行所发行

2007 年 7 月第 1 版 2007 年 7 月北京第 1 次印刷。

开本: 720mm×960mm 1/16 印张: 14. 25

字数: 255 千字

定价: 19. 50 元

(凡本版图书出现印刷、装订错误, 请向出版社发行部调换)

内 容 简 介

本教材简明扼要地介绍了植物和动物细胞工程实验方法的基本理论和原理,详细叙述了实验的具体操作技术。全书分为3篇:细胞工程实验基础知识、植物细胞工程实验和动物细胞工程实验,共有42个实验。植物细胞工程实验包括植物培养基的配制、离体茎段快速繁殖、体细胞胚状体诱导、体细胞分离和培养、原生质体培养和融合、花粉和花药培养、种质超低温保存、植物基因转化等19个实验。动物细胞工程实验包括常用液体的配制、精子和卵母细胞的采集与观察、小鼠胎儿成纤维细胞原代培养和传代培养、体外培养细胞生长曲线测定和染色体分析、动物细胞融合、家兔和羊超数排卵及胚胎移植、小鼠胚胎体外培养、小鼠胚胎干细胞分离与克隆培养、转基因细胞的制备等23个实验。

细胞工程主要是对植物和动物的组织和细胞进行离体操作的一门实验性很强的学科,因此,本教材可作为生物工程、生物技术及其他生命科学专业本专科生及研究生的细胞工程实验教材,亦可供相关专业教师和科研人员参考。

主 编 王 蒂 (甘肃农业大学)

副 主 编 马保华 (西北农林科技大学)

编写人员 (以姓氏笔画为序)

马保华 (西北农林科技大学)

王 蒂 (甘肃农业大学)

王永清 (四川农业大学)

司怀军 (甘肃农业大学)

华进联 (西北农林科技大学)

刘清波 (湖南农业大学)

张俊莲 (甘肃农业大学)

赵晓娥 (西北农林科技大学)

雷安民 (西北农林科技大学)

前 言

细胞工程是以生物细胞或组织为研究对象,运用工程学原理,按照预定目标,改变生物性状,生产生物产品,为人类生产或生活服务的科学。细胞工程是现代生物技术的重要组成部分,同时也是现代生物学研究的重要技术工具。

近年来细胞工程的实验技术突飞猛进,促使我们必须将国内外先进的实验内容和技术反映到教学中去。根据细胞工程教学上的要求,参考已出版的细胞工程方面的书籍,在总结历年来教学实践经验的基础上,挑选了我们在教学和科研中所用过的一些实验方法,并收集了部分国内外较先进的实验方法,编成了这本细胞工程实验教程。本实验教程的特点是对实验原理具有较详细的阐述,能够使学生在做实验前掌握很好的实验背景和原理;同时具有很强的实用性,从实验选材、实验设计、实验操作到实验结果的分析,都是经过多次实践和反复证明,具有很好的重复性。在附录中收录了植物常用培养基成分表、动物细胞工程常用试剂的配制以及实验小鼠的特性及饲养管理,从而便于培养基的查找和配制,以利实验顺利进行。另外,书中还收录了许多实验照片,便于读者对实验现象进行直观观察和了解。

全书分为3篇:细胞工程实验基础知识、植物细胞工程实验和动物细胞工程实验,共有42个实验。其中,细胞工程实验基础知识由王蒂和马保华编写;实验一、实验五、实验七至实验十二、实验十六和实验十七、附录I由王蒂、司怀军和张俊莲编写;实验二至实验四、实验六和实验十五由刘清波编写;实验十三和实验十四由王永清编写,实验十八和实验十九由王永清和司怀军编写;实验二十至实验四十二、附录II和附录III由马保华、华进联、赵晓娥和雷安民编写。全书由王蒂、司怀军和张俊莲统稿和定稿。

前言

由于我们的水平所限，书中的缺点和错误在所难免，敬请批评指教，以便今后补充修订。

王 蒂

2007 年 4 月

目 录

前言

第一篇 细胞工程实验基础知识

一、实验室规章制度与规范	2
二、细胞工程基本实验室操作技术	6
三、细胞工程实验报告的书写	14

第二篇 植物细胞工程实验

实验一 植物培养基的配制及灭菌	18
实验二 培养材料的灭菌和接种及愈伤组织的诱导和分化	23
实验三 叶组织诱导不定芽——烟草和百合快速繁殖	28
实验四 葡萄离体茎段快速繁殖	31
实验五 马铃薯茎段快繁和微型薯生产	34
实验六 苜蓿和胡萝卜体细胞胚状体诱导	38
实验七 马铃薯茎尖培养和脱毒	42
实验八 烟草叶片单细胞分离和培养	46
实验九 烟草细胞悬浮培养	51
实验十 烟草体细胞原生质体分离、活力测定和培养	55
实验十一 马铃薯体细胞杂交——原生质体的化学融合	61
实验十二 马铃薯体细胞杂交——原生质体的电融合	66
实验十三 植物花粉发育时期和活力鉴定	70
实验十四 烟草花粉和花药培养	75
实验十五 小麦幼胚和水稻成熟胚培养	79
实验十六 葡萄试管苗的生长抑制剂保存	82
实验十七 植物愈伤组织和茎尖超低温保存	85
实验十八 农杆菌介导法获得转基因烟草植株	91
实验十九 基因枪法获得转基因烟草植株	94

第三篇 动物细胞工程实验

实验二十	动物细胞工程实验常用液体的配制	100
实验二十一	小鼠睾丸、附睾及输精管精子采集、运动能力检测与 结构观察	108
实验二十二	小鼠超数排卵及输卵管卵母细胞采集与结构观察	111
实验二十三	小鼠植入前不同发育阶段胚胎采集与结构观察	116
实验二十四	小鼠胎儿成纤维细胞原代培养与传代培养	121
实验二十五	小鼠胎儿成纤维细胞饲养层制备	125
实验二十六	小鼠胎儿成纤维细胞活性检测	127
实验二十七	体外培养细胞生长曲线测定	129
实验二十八	体外培养细胞染色体分析	132
实验二十九	动物细胞融合与融合细胞的选择培养	136
实验三十	小鼠胚胎移植	141
实验三十一	家兔超数排卵及胚胎移植	146
实验三十二	羊超数排卵及胚胎移植	150
实验三十三	体外培养细胞的冻存与解冻复苏	156
实验三十四	小鼠胚胎冷冻、解冻与冻后活力检测	159
实验三十五	小鼠输卵管卵母细胞体外受精	162
实验三十六	小鼠胚胎体外培养	165
实验三十七	牛卵巢卵母细胞体外成熟、体外受精与受精卵体外培养	167
实验三十八	小鼠胚胎干细胞分离与克隆	170
实验三十九	小鼠胚胎分割(演示)	174
实验四十	细胞核移植器械的制作及小鼠胚胎细胞核移植(演示)	178
实验四十一	转基因细胞的制备(脂质体转染法)	184
实验四十二	人工诱导小鼠卵母细胞孤雌发育	187
附录 I	植物培养基成分表	191
附录 II	动物细胞工程常用试剂配制	200
附录 III	实验小鼠的特性及饲养管理	208
主要参考文献		217

一、实验室规章制度与规范

(一) 学生实验守则

①实验前应预习实验教材，明确实验原理、目的、要求、方法及步骤，熟悉所用仪器设备的性能及操作规程，做好实验准备。

②进入实验室，要严格遵守实验室各项规章制度，衣着及所携带物品符合实验要求，按规定位置就位。

③保持室内安静、整洁，不乱倒废物及实验产生的废料，不高声喧哗，严肃自律，不影响他人实验。

④实验时要遵从老师指导，遵守操作规程，认真操作，仔细观察，积极思考，努力培养自己分析问题和解决问题的能力。

⑤如实记录实验数据，分析实验现象，做完实验认真复查，如有错漏，及时更正或补做。

⑥要爱护仪器设备，节约水、电、试剂、药品和器材。凡损坏或丢失仪器、材料、工具等，均应及时报告并登记，按规定处理。

⑦实验结束要整理实验台面，收拾实验仪器、器材，打扫卫生。离开实验室时，要注意切断电源、水源、气源，经许可方可离开。

⑧按时完成实验报告，认真做好实验后的复习和总结，真正掌握所学知识。

(二) 实验室安全管理制度

1. 实验室安全管理一般守则

①实验室对所有实验人员及学生进行安全教育，牢固树立安全意识。根据实验室设备、环境及实验特点，制定防火、防爆、防盗、防事故等安全管理措施，并严格执行。

②仪器室、重点要害部位及使用和存放易燃、易爆及危险品的场所要重点防护，安全措施到位。

③从事生物安全相关的实验要严格按照国家的有关规定进行，在实验中严格控制，防止病原微生物及其污染物的扩散，严格制定人员及环境保护措施，并定期检查，出现问题及时上报上级主管部门。

④室内水电、管线设施必须按要求装配,不得乱接乱拉、随意拆装、改线。各类在用设备应保持完好安全状态。

⑤实验室必须配备符合规定的消防器材,放置于明显位置,专人负责管理,定期检查,确保有效可用。

⑥实验室钥匙由专人管理,不得私自配备或转借他人。工作人员离开实验室前,必须关好门、窗、水、电、气等,保管好贵重物品。节假日前,要对实验室进行全面安全检查,确保安全。

⑦实验室要定期进行安全检查,发现安全隐患应及时排除;不能自行排除的,报告有关部门处理。如发生事故,应及时采取措施,并如实报告。

2. 实验室药品安全使用管理规定

①使用任何药品,请先看清楚标示、注意事项,翻阅物质安全资料表,查明是否对人体造成伤害,使用完毕请放回原位。

②新配制的试剂请注明内容物、浓度、注意事项及配制日期,为避免污染,勿将未用完的药剂倒回容器内。

③挥发性、腐蚀性、有毒溶剂(如甲醇、丙酮、醋酸、氯仿、盐酸、硫酸、酚等)要在通风橱中戴手套量取配制,取用完后随即盖好盖子,若不小心打翻试剂,马上处理。

④有毒、致癌药剂如丙烯酰胺(神经毒剂)、溴化乙锭(致癌剂)、秋水仙素等请戴手套及口罩取用,并避免污染其他物品,脱下手套后,应养成洗手的好习惯。

⑤接触到病原材料或细菌,应迅速消毒。所有被污染的物品,在丢弃或重复使用前均需先灭菌,固体培养基不得倒入水槽或下水道中。

⑥使用刻度吸管取药品时,切勿用嘴吸取,请用自动吸管或安全吸球。

3. 实验室仪器安全使用管理规定

①使用仪器前先了解其性能、配置及正确操作方法,零件及附件严禁拆卸,勿私自调整,并注意插座电压(110 V或220 V)之类别。

②使用离心机时,离心管要两两对称、重量平衡,锁紧离心机转子。冷冻离心机于开机状态时,务必盖紧盖子,以保持离心槽之低温并避免结霜。

③实验时不要用潮湿有汗的手去操作电器,不要用手紧握可能荷电的电器,不应以两手同时触及电器,电器设备外壳均应接地。万一不慎发生触电事故,应立即切断电源,对触电者采取急救措施。

④使用层流净化通风系统时应注意,实验室净化区有超过半个工作日的实验工作时,应开启层流净化通风系统。实验室长时间无实验工作时,每周运行4~8 h层流净化通风系统。

⑤臭氧发生器不能单独开启,在通风系统运行的情况下才能使用,否则会损坏设备。有人在室内工作时严禁开启臭氧发生器。

⑥使用微波炉加热时,不可有铝箔等金属物品,瓶盖必须松开,以免爆炸。加热后戴防热手套取出瓶子。

⑦使用紫外灯观察时,不要以眼睛直视,应隔着挡板观察,完毕立即关灯。

⑧使用紫外线杀菌灯时应注意,实验期间室内紫外线杀菌灯每天由实验室本周值班人员定时开、关。超净工作台紫外线杀菌灯由使用者在实验前开启杀菌,实验后再次开启杀菌,达到规定时间随即关闭;课程实验时由实验室管理人员在实验前、后开启杀菌。

⑨超净工作台内的酒精等有机溶剂及易燃物(如甲醇、乙醇、乙醚、瓦斯等)要远离火苗,不可留置火焰燃烧,万一着火,应保持镇定,沉着处理。酒精、乙醚等着火时,应使用泡沫灭火剂或湿毛巾覆盖,勿使用水冲洗。

⑩使用振荡器振荡培养时,注意三角瓶务必对称放置,并用橡皮筋等夹紧,勿使其摇晃摔出台面,否则需拆开并清除玻璃碎片与培养液。

4. 实验室急救措施

①急性呼吸系统中毒时,应使中毒者迅速离开现场,移到通风良好的地方,呼吸新鲜空气。如有休克、虚脱或心肺机能不全,必须先做抗休克处理,如人工呼吸、给予氧气。

②经由口服而中毒时,需立即用3%~5%小苏打溶液或1:5 000高锰酸钾溶液洗胃,洗胃时要大量地喝,边喝边使之呕吐,最简单的催吐办法是用手指或筷子压舌根,或给中毒者喝少量(15~25 mL)1%硫酸铜或硫酸锌溶液(催吐剂),使之迅速将毒物吐出。洗胃要反复进行多次,直至吐出物中基本无毒物为止。然后再服解毒剂,一般解毒剂有鸡蛋清、牛奶、淀粉糊、橘子汁等。另外,有些特殊解毒剂专对某种中毒而用,如磷中毒时用硫酸铜、钡中毒时用硫酸钠、氰化物中毒时用硫代硫酸钠等。

③皮肤、眼、鼻、咽喉受毒物侵害时,应立即用大量自来水冲洗,然后送医院请专科医生处理。

④一度烧伤时,只损伤表皮,皮肤呈红斑,微痛,微肿,无水泡。如被化学药品烧伤,应立即用大量水冲洗,除去残留在创面上的化学物质,并用冷水浸沐伤处,可减轻疼痛,最后需要消毒,保护创面不受感染。

⑤二度烧伤时,损伤表皮及真皮层,皮肤起水泡,疼痛,水肿明显。创面如污染严重,先用清水或生理盐水冲洗,再以1:1 000新洁尔灭消毒,不要挑破水泡,用消毒纱布轻轻包扎好,请医生治疗。

⑥三度烧伤时,损伤皮肤全层,包括皮下组织、肌肉、骨骼,创面呈灰白色或焦黄色,无水泡,不痛,感觉消失。在送医院前,主要防止感染和休克,可用消毒纱布轻轻包扎好,给伤者保暖和供氧。

⑦炸伤时,其急救措施基本同烧伤处理。但炸伤后伤口往往大量出血,应立即将伤口上部扎紧,防止流血过多。如发生昏迷、休克等,应进行人工呼吸,给氧,并送医院治疗。

⑧电击伤:急救时首先使触电者脱离电源,为此可拉下电闸或用木棍将触电者从电源上拨开(当心别把触电者摔伤)。断开电源后,检查伤员呼吸和心跳情况,若呼吸停止,立即进行人工呼吸。对心跳亦停止者要同时进行心脏挤压。电击伤比较轻微者,很快能恢复健康,重者必须请医生治疗。应该注意,触电者进行急救时,一般不要注射强心针和喝兴奋剂。

(三) 仪器设备丢失损坏赔偿制度

①贯彻勤俭办学方针,增强师生爱护公物的责任心与自觉性,尽量减少丢失损坏,确保设备器材完整、安全和有效使用。

②凡由于不听指导、不按规程、工作失职、擅自拆改、不遵守规章等主观原因造成损失的,根据物质性质、事故情节、本人态度等,赔偿损坏价值的全部或一部分。

③凡由于设备陈旧、缺陷或因实验操作本身的特殊性,存在难于避免的客观原因,在正常使用中引起的损坏,从轻或免于赔偿。

④实验室发生设备器材损坏、丢失事故,要及时报告,迅速查明原因,分清责任,及时处理。赔偿金额较小时由实验室主任直接审核决定,赔偿金额较大时需经院、系签署意见后,交由设备主管部门审批处理。

⑤发生责任事故时,当事人应主动写出书面检查。发生事故后隐瞒不报、推诿责任、态度恶劣、损失重大的,从重处罚,并可根据情节进行处分,直至追究法律责任。

⑥仪器设备损失赔偿费应由当事人一次交清,不得报销。所收缴的赔偿费应按规

二、细胞工程基本实验室操作技术

细胞工程实验的操作是在无菌条件下进行的,需要建立一套满足无菌操作技术和无菌培养的环境。可以通过无菌操作过程获得植物和动物组织、细胞、器官等无菌培养物,并在适宜环境条件下生长、发育、繁殖。动物配子及胚胎的体外操作也需要在相当严格的无菌条件下进行,才能获得诸如胚胎移植、胚胎体外生产、克隆动物等胚胎工程研究和应用的成功。

细胞工程的操作对象,对操作器具带来的毒性非常敏感,体外培养中任何与培养物接触的有害物质都会影响培养物的体外生长和增殖,微生物、细胞碎片、非营养性化学物质等都可能干扰正常的实验结果。培养工作开始之前,必须对实验室所使用的培养器具进行彻底清洗、灭菌,清除可能残存的细胞毒性物质。不进行培养时,培养物操作器械、物品,也应按照要求进行清洗、消毒灭菌。

细胞工程实验室的基本操作技术主要包括清洗、消毒灭菌、无菌操作及实验室日常维持等基本环节。该项操作技术虽然简单,但要求仔细耐心,它对保证实验的成功十分重要。所以,应力求通过各项操作步骤,使实验物品保持无菌状态,满足实验最基本的要求。

(一) 清洗与包装

1. 物品清洗 新的或用后的各种器皿,包括玻璃器皿、塑料器皿、金属器械、除菌滤器等都应严格清洗。新购置的玻璃器皿,常有游离碱性物质,并附有一些对细胞和胚胎培养有害的物质,如重金属及灰尘等。因此,新的玻璃器皿在使用前应彻底清洗并经过一定的化学处理。可先在清水中冲洗,晾干水分后在洗液中浸泡过夜,再经流水冲洗 6 h 以上。必要时,还需经 1% 盐酸溶液浸泡数小时,再用流水冲洗数小时,经蒸馏水漂洗 3 次以上,最后用重蒸馏水或去离子水漂洗 2 次,60 °C 烘干备用。已用过的玻璃器皿用洗涤剂刷洗,刷洗时用力要轻,防止损伤器皿表面或造成划痕,或用超声波清洗仪清洗,清洗后用流水冲洗数小时,经蒸馏水漂洗 3 次以上,最后用重蒸馏水或去离子水漂洗 2 次,烘干备用。

新的已灭菌的塑料器皿打开即可以使用。已用过的塑料器皿应先用清水充分浸泡,或用超声波清洗仪清洗,冲洗干净,再用 2% NaOH 溶液浸泡过夜,

再用流水冲洗数小时。然后用1%稀盐酸浸泡数小时，流水冲洗数小时，最后用蒸馏水漂洗3次，重蒸馏水或去离子水漂洗2次，晾干后备用。

新的金属器皿用热洗涤剂溶液洗净，再用清水冲洗，擦干或烘干即可。

培养器皿已受微生物污染时，先用高压蒸汽灭菌后再清洗。需重复使用的玻璃除菌滤器用清水冲洗后，用洗液冲洗，硫酸抽滤清洗，再用清水冲洗，之后用蒸馏水连续抽滤冲洗，最后用重蒸馏水连续抽滤冲洗，烘干备用。

2. 清洗后物品的包装 洗净烘（晾）干的物品应及时包装，以备消毒灭菌和储存。包装常用硫酸纸、牛皮纸、纱布、棉布、锡箔纸、铝盒、饭盒、专用金属消毒筒等。包装的方式根据消毒灭菌的方法而有所不同。对于体积较大的器皿（如大烧杯、烧瓶等）、滤器等容器，可采用局部包装的方法。把开口部分用硫酸纸及牛皮纸或棉布等两层紧密包装，包好后用棉线绳扎紧。对于较小的器皿，如培养皿、玻璃吸管、注射器、胶塞等，可以用硫酸纸及牛皮纸等两层整体包装。金属器械、棉塞等可以先装入铝盒、饭盒或消毒筒中，然后用棉布全部包裹起来。手术器械、手套、工作衣等可以用布直接包裹。一般全包装物品体积不能过大，可以用线绳捆扎，但不可太紧。放有物品的铝盒、饭盒、消毒筒等的底部和四周需要有多处通气孔，盒盖或筒盖不宜过紧。多个相同容器不易辨别时，应分别注明内装用品的名称，每一容器内的用品不宜放置过多、过密。注射器的针筒和针头要分开并一起包装。吸管包装盒的底部垫一些脱脂棉或软纸、纱布，管口放入少许脱脂棉或纱布，包装松紧适宜，以免吸管头被撞断。

（二）消毒灭菌

严格的消毒灭菌对细胞工程研究与应用工作极为重要，直接影响着整个实验能否顺利进行。

1. 消毒灭菌方法 目前常用的消毒灭菌方法分为物理方法（如干热灭菌法、湿热灭菌法、过滤除菌法、射线杀菌法等）和化学方法（消毒剂、抗生素）两大类。

（1）干热灭菌法 这是利用恒温干燥箱内120~180℃的高热，并保持90~120 min，杀死细菌和芽孢，达到灭菌目的的一种方法。此法主要适用于不便在压力蒸汽灭菌器中进行灭菌，且不易被高温损坏的玻璃器皿、金属器械以及不能和蒸汽接触的物品的灭菌。用此方法灭菌的物品干燥，易于储存。酒精灯火焰烧灼灭菌法也属于干热灭菌方法。在进行细胞工程操作时，常利用工作台面上的酒精灯火焰对金属器具及玻璃器皿的口缘进行补充灭菌。

（2）湿热灭菌法 压力蒸汽湿热灭菌法是目前最常用的一种灭菌方法。它

利用高压蒸汽的潜热作用和良好的穿透力,使菌体蛋白质凝固变性而使微生物死亡。此法适合于布类工作衣、各种器皿、金属器械、胶塞、蒸馏水、棉塞、纸和某些培养液的灭菌。高压蒸汽灭菌器的蒸汽压力一般调整为 $9.8 \times 10^4 \sim 1.078 \times 10^5$ Pa ($1.0 \sim 1.1$ kgf/cm²),维持 20~30 min 即可达到灭菌效果(表 1-1)。

表 1-1 饱和水蒸气压力与其对应的温度

饱和水蒸气压力		温度 (°C)	饱和水蒸气压力		温度 (°C)
lbf/in ²	kgf/cm ²		lbf/in ²	kgf/cm ²	
0	0.000	100	15	1.055	121.0
1	0.070	101.9	16	1.125	122.0
2	0.141	103.6	17	1.195	123.0
3	0.211	105.3	18	1.266	124.1
4	0.281	106.9	19	1.336	125.0
5	0.351	108.4	20	1.406	126.0
6	0.422	109.8	21	1.476	126.9
7	0.492	111.3	22	1.547	127.8
8	0.563	112.6	23	1.617	128.7
9	0.633	113.6	24	1.687	129.6
10	0.703	115.2	25	1.758	130.4
11	0.773	116.4	26	1.828	131.2
12	0.844	117.6	27	1.898	132.0
13	0.914	118.8	28	1.969	133.0
14	0.984	118.9	29	2.039	133.8

注: 1 lbf/in²=47.88 Pa; 1 kgf/cm²=9.8×10⁴ Pa。

一些实验室使用进口高压蒸汽灭菌器,其蒸汽压力一般以 MPa 表示,表 1-2 为以 MPa 表示的饱和水蒸气压力与其温度的对应关系。

表 1-2 以 MPa 表示的饱和水蒸气压力与其对应的温度

温度 (°C)	100	102	104	106	108	110	112
水蒸气压力 (MPa)	0.101 33	0.108 78	0.116 68	0.125 04	0.133 90	0.143 27	0.153 16
温度 (°C)	114	116	118	120	122	124	126
水蒸气压力 (MPa)	0.163 62	0.174 65	0.186 28	0.198 54	0.211 45	0.225 04	0.239 33
温度 (°C)	128	130	132	134	136	138	140
水蒸气压力 (MPa)	0.254 35	0.270 13	0.278 31	0.304 07	0.322 29	0.341 38	0.361 38

(3) 射线灭菌法 这是利用紫外线灯进行照射灭菌的方法。紫外线是一种低能量的电磁辐射,可以杀灭多种微生物。紫外线的作用机制是通过对微生物的核酸及蛋白质等的破坏作用而使其灭活。此法适合于实验室空气、地面、操