

[2] PETER K, A, JENSEN et al., 1982, *In Vitro*, 18 : 867-871.

[3] JAMES G. RHEINWALD et al., 1975, *Cell*, 6 : 331-344.

在细胞培养无菌操作中试用火焰消毒无菌连接器*

张君奎

(中国医学科学院天津血液学研究所)

在细胞培养工作中目前主要是依靠无菌室、超净台等进行无菌操作。某些细胞培养装置，虽采用了普通密封技术，但也必须在净化环境中进行操作。现有技术的不足之处是：1. 无菌室与超净台等，其净化空间范围较大，难以达到绝对无菌的程度，故污染现象时有发生，而且这些设备造价较高，难以普遍应用；2. 在采用管道密封方式进行细胞培养时，当培养装置整体消毒运行之后就不能随意打开，也不能更换组件，操作很不灵活，而且改变连接方式时就必须重新组装连接，再进行整体消毒，劳动量较大。

美国杜邦公司发明了一种无菌连接装置^[1]，主要用热熔塑料管道的无菌连接，在普通带菌空间就可操作。在家庭透析治疗尿毒症时有人使用这种装置，能显著地减少连接处的污染发生率，也减少了其并发症腹膜炎的发病率^[2]。该连接装置打破了传统的无菌操作方式，在无菌操作技术上是一个进步，其局限性在于，它仅能适用于热塑管道的无菌“焊”接。

作者研制成功的火焰消毒无菌连接器(Flame-disinfecting Sterile Connector, FSC)突破了这一局限性，可用于各种管道进行无菌操作^[3]。本文对其结构以及在细胞培养无菌操作中的试用情况作一报道。

一、FSC 构造原理与操作程序

火焰可用一般灯火，如酒精灯，其温度为1400℃。空气中以及物体表面的任何细菌和真菌孢子在火焰中都会在瞬间被烧毁。故在局部

用火焰灭菌是最彻底最迅速的消毒方法。本连接器的设计即基于这一原理。FSC 主要由双阀门体(1)(2)、插针(3)和插座(4)三部分组成(图1)。阀门由不锈钢等金属材料制造，另外也设计了一次性使用的非金属阀门。插针为医用不锈钢针管。插座由硅橡胶制成。双阀门体由阀门(1)和(2)以可拆卸的方式连接而成，在两个阀门的接口处装有耐火密封垫圈(5)，此处为火焰消毒区。当双阀门断开时，每个阀门呈关闭状态。阀门具有良好耐气体密封性能，可阻止外界带菌空气进入无菌管道系统。连接时，将两个阀门的接口用酒精灯火焰烧烤约1分钟，并在火焰中进行密封连接；待冷却至37℃以下时，可开启阀门孔道，这样，管道内部的无菌空间贯通而不会被污染。使用前，连接器及其保护的管道系统皆要经过高压蒸汽灭菌，然后在普通带菌空间进行断接操作。由于解决了高温密封、高温润滑以及双阀门体严格的气密性等问题，这样从结构设计上保证了杜

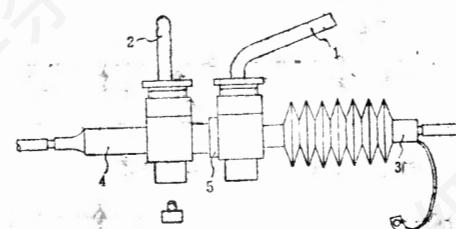


图1 火焰消毒无菌连接器

* 已申请专利并获中国专利局授权^[3]。
卢润生和赵一维同志参加了部分试制工作，特此致谢。

绝一切细菌及一切污染源从连接器的活动部位进入管道系统。

为了避免火焰高温对培养液等工作流体的有害影响,因此在双阀门孔道中设计了内层插接管道,由插针(3)和插座(4)组成。当双阀门通过火焰完成密封连接并待其冷却后,可开启阀孔,让插针(3)穿过双阀和火焰消毒的接口密封区,针头进入插座(4)的衔接机构,并被紧固。培养液不接触阀门,仅在插针插座管道内部流动,故阀门材料对培养液毫无影响。其结构简单,操作方便,可大量制造(上海四科理化工程技术服务中心附属工厂已投产)。

二、试用情况及结果

FSC 在投入使用前要通过压力检漏试验。试用时将 FSC 分别安装在三通玻璃培养瓶、无菌过滤系统和灌注式细胞培养装置中,经灭菌后在普通带菌空间进行操作。

用于配制培养液的无菌过滤系统由除菌滤器、贮液袋和分装袋 3 部分组成(图 2)。新配制的培养液以正压过滤除菌方式通过滤器(A),流经连接器(ab')和截止阀(D),进入贮液袋(B)。当滤器被堵时,可断开连接器(ab'),换上新的带有连接器的滤器。滤毕,通过截止阀(E)和连接器(bc),将无菌培养液注入分装袋(C),分别关闭阀门,断开接口,冷藏备用。

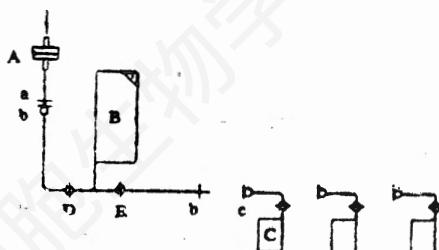


图 2 无菌过滤与分装示意图

— 火焰消毒无菌连接器 — 截止阀
A. 滤器 B. 贮液袋 C. 分装袋

灌注式细胞培养装置为自行组装(图 3),由贮液瓶(D)和(E),三通培养瓶(A)或(B),泵(G)以及调节系统(F)等组成。输液袋(C)将培养液通过连接器(CC')注入灌注系统。

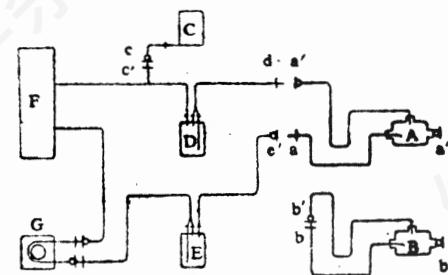


图 3 装有无菌连接器的灌注式细胞培养装置示意图

— 火焰消毒无菌连接器 A 和 B. 培养瓶 C. 输液袋 D 和 E. 贮液瓶 F. 气压 CO_2 和 pH 调节系统 G. 泵

在试验 FSC 防污染功能时,以其所保护的培养物是否被细菌和霉菌污染作为判断标准。培养液主要由 IMDM 或 RPMI 1640 80%, 加新生牛血清(BS)20% 组成, pH 7.0--7.4, 不加抗生素。从瓶口的 FSC(a'')接种细胞进入培养瓶(A)。在需要时进行 FSC 断接操作试验;其断接操作一次的过程如下:以培养瓶(A)为例(图 3)。首先使其所带的连接器(aa')处于退针状态,即插针脱离插座,关闭阀门,双阀从接口处断开。通过酒精灯火焰将(aa')连接到灌注系统连接器(de')上,开动输液泵,通液约 1 分钟后停泵,再按程序断开 FSC,使瓶(A)脱离灌注系统, FSC(aa')自锁,静置 37℃ 培养。

本实验按单瓶分别进行试验与观察。为了考察 FSC 长远使用效果,安排了无细胞培养试验,培养瓶通过除菌滤器注入培养液后不再接种细胞,其他操作同前。其对照为 25-mL 普通培养瓶,胶塞封口,用同一除菌滤器注入培养液,一切操作与试验瓶同步。结果见表。

试验结果令人满意,证明在普通带菌空间 FSC 经过长期反复断接操作,其防污染功能十分可靠,达到了设计要求。培养液反复流经 FSC 的插针和插座,未发现该材料对培养物有什么不良影响。三通培养瓶内培养的小鼠骨髓细胞生长良好,基质细胞伪足舒展而透明,还观

FSC 无菌操作试验结果表

培养物	培养液 (不加抗菌素)	FSC 断接 操作次数	培养持续 时间(天)	结 果
病人骨髓	IMDM + BS	3	7	
病人骨髓	IMDM + BS	2	8	
小鼠骨髓	RPMI 1640 + BS	3	15	
小鼠骨髓	RPMI 1640 + BS	16	33	
小鼠骨髓	RPMI 1640 + BS	13	26	
无细胞培养	IMDM + BS	21	60	
无细胞培养 对照	IMDM + BS	(开胶塞) 2	8	有霉菌生长

察到一些呈集落状生长的细胞团,类似造血灶。

三、应用前景

1. FSC 性能可靠,适用于任何无菌管道和腔体。在普通带菌空间,特别是在多尘多菌地区,应用 FSC 能完成各种严格的无菌操作。它可能发展成为一种完全脱离无菌室与超净台的新的管道化无菌操作技术系统。它不受设备条件的限制,可普遍用于城乡各地及野外作业。

2. FSC 从结构上保证了杜绝各种污染源从其活动部位进入管道系统,而且火焰灭菌非常彻底,对工作流体毫无影响,这是 FSC 最突出的优点,因此可实现最严格的无菌操作实验与作业。在一个要求绝对无菌的体系中,利用 FSC 技术可保持该体系在长期反复断接操作过程中处于绝对无菌状态,这是常规技术难达到的。

3. FSC 将有助于推动细胞培养技术向管道化、自动化方向发展,有利于灌注式细胞培养技术走向普及。它除了能用于动植物细胞培养装置、生物反应器和微生物发酵罐之外,还可用于输血输液、腹膜透析、人工肾、人工心肺机和某些生化仪器,可普遍用于生物学及医

学管道系统的无菌操作之中。预计由于需求的多样化,无菌连接器将会发展成为具有多种用途的系列产品,将同现有的无菌操作技术互相补充,并行发展。

摘要

火焰消毒无菌连接器在细胞培养无菌操作中经试用证明完全符合设计要求。它适用于各种无菌管道的断开与连接的无菌操作,对其中的工作流体毫无影响。特别适用于多尘多菌地区及野外作业。它可能发展成为一种完全脱离无菌室与超净台的新的管道化无菌操作技术系统。

参考文献

- [1] Du Pont De Nemour and Company, 1984, Sterile thermoplastic tubes joining apparatus. European Patent Office, EP 104718 A.
- [2] Moncrief, J. W., 1986, *Artif. Organs* 10 (4) : 298.
- [3] 张君奎, 1988, 火焰消毒无菌连接器, 中国专利局, 申请号: 88208108. X

〔简讯〕

“火焰消毒无菌连接器”学习班,1990年3月15日开办欲参加者请在1990年2月1日前与上海市岳阳路320号四科理化工程技术服务部马振强、张峰联系。电话:4315030×81 邮政编码:200031