

ICS 07.080

CCS C 44



团 标 准

T/CEATEC XXX—2025

基于微流控芯片的高通量血管化类 器官培养技术规范

Technical specification for the high-throughput culture of vascularized
organoids based on microfluidic chips

(征求意见稿)

2025-X-XX 发布

2025-X-XX 实施

中国欧洲经济技术合作协会 发布

目 次

前言	III
1 范围	1
2 规范性引用文件	1
3 术语和定义	1
4 缩略语	1
5 总体要求	2
5.1 芯片设计要求	2
5.2 培养体系要求	2
5.3 操作过程要求	2
6 芯片设计与制备要求	2
6.1 材质要求	2
6.2 结构设计要求	2
6.3 性能指标	3
6.4 制备过程控制	3
7 培养要求	3
7.1 试剂要求	3
7.2 仪器设备要求	3
7.3 培养操作流程	4
8 质量控制要求	4
8.1 原材料质量控制	4
8.2 过程质量控制	4
8.3 成品质量控制	4
9 人员要求	4
9.1 资质要求	4
9.2 技能要求	5
9.3 培训与考核	5
10 环境要求	5
10.1 核心培养环境	5
10.2 辅助环境	5
10.3 环境监测	5
11 安全要求	5
11.1 生物安全	6
11.2 化学品安全	6
11.3 设备安全	6

11.4 记录与追溯 6

前言

本文件按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由中国欧洲经济技术合作协会提出并归口。

本文件主要起草单位：。

本文件主要起草人：。

本文件为首次编制。

基于微流控芯片的高通量血管化类器官培养技术规范

1 范围

本文件规定了基于微流控芯片的高通量血管化类器官培养的缩略语、总体要求、芯片设计与制备要求、培养要求、质量控制要求、人员要求、环境要求、安全要求。

本文件适用于生物医学研究、药物筛选、毒性评估等领域中，采用微流控芯片进行肝脏、肾脏、心脏等器官来源VO的高通量培养。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

- GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法
- GB 9706.1 医用电气设备 第1部分：基本安全和基本性能的通用要求
- GB/T 16293 医药工业洁净室（区）浮游菌的测试方法
- GB 19489 实验室 生物安全通用要求
- GB/T 37864 生物样本库质量和能力通用要求
- GB/T 39730 细胞计数通用要求 流式细胞测定法
- JJF 1402 生物显微镜校准规范
- YY/T 1540 医用II级生物安全柜核查指南

3 术语和定义

GB/T 37864界定的以及下列术语和定义适用于本文件。

3.1

微流控芯片 microfluidic chip

基于微机电系统技术制备，包含微米级通道、培养室等结构，可实现流体精准操控的芯片载体。

3.2

高通量 high throughput

单次实验可同时培养 ≥ 96 个独立VO单元，且每个单元培养条件变异系数 $\leq 5\%$ 的技术能力。

3.3

血管化类器官 vascularized organoid

由器官特异性干细胞分化形成，包含功能性血管网络，且具备目标器官部分生理功能的三维微组织。

3.4

类器官培养基 organoid medium

用于VO培养的专用培养基，包含基础营养成分、生长因子及血管诱导因子等。

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

- bFGF：碱性成纤维细胞生长因子 (basic Fibroblast Growth Factor)
- CD31：血小板内皮细胞粘附分子 (Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1)
- FBS：胎牛血清 (Fetal Bovine Serum)
- HT：高通量 (High Throughput)
- MFC：微流控芯片 (Microfluidic Chip)
- OM：类器官培养基 (Organoid Medium)
- PBS：磷酸盐缓冲液 (Phosphate Buffered Saline)
- VEGF：血管内皮生长因子 (Vascular Endothelial Growth Factor)
- VO：血管化类器官 (Vascularized Organoid)

5 总体要求

5.1 芯片设计要求

芯片设计应满足类器官三维培养和血管化需求：

- a) 应具备适配VO三维生长的结构，确保每个VO单元获得均匀的营养供给与气体交换；
- b) 应支持血管诱导因子的精准输送，满足血管网络形成的微环境需求。

5.2 培养体系要求

要求如下：

- a) 稳定性：培养基成分、仪器参数在培养周期内波动范围应符合技术要求；
- b) 可控性：可通过微流控泵系统精准调节流体流速，通过倒置显微镜实时监测VO生长及血管化进程；
- c) 可重复性：同一批次及不同批次实验中，VO的贴壁率、直径、血管化占比等关键指标变异系数 $\leq 5\%$ 。

5.3 操作过程要求

所有操作应在符合GB 19489规定的生物安全环境中进行，生物安全柜洁净度应达到Class 5，涉及细胞、试剂的操作应遵循无菌原则。

6 芯片设计与制备要求

6.1 材质要求

材质要求如下：

- a) 主体材质：聚二甲基硅氧烷或硼硅玻璃，级细胞毒性 ≤ 1 级；
- b) 密封材质：氟橡胶密封圈（耐温-20~121℃），无细胞毒性，且在0.2MPa压力下无泄漏；
- c) 连接部件：医用级聚乙烯(PE)或聚丙烯(PP)，无菌，与培养基、细胞无相互作用。

6.2 结构设计要求

芯片结构应满足高通量培养及流体操控需求，具体参数见表1。

表1 结构参数

结构单元	参数要求	公差范围
培养室数量	≥ 96 个 (4×24 阵列)	± 1 个
单个培养室体积	5~10 μ L	$\pm 10\%$
流体通道宽度	200~500 μ m	$\pm 10\%$
流体通道深度	100~200 μ m	$\pm 10\%$

结构单元	参数要求	公差范围
进/出样口直径	1.0~2.0mm	±0.1mm

6.3 性能指标

性能指标应包括：

- a) 密封性：0.2MPa压力下保压30min，无泄漏；
- b) 透光率：可见光（550nm）透射比≥90%；
- c) 温度均匀性：37℃时芯片各培养室温差≤0.5℃；
- d) 生物相容性：与干细胞、血管内皮细胞共培养72h后，细胞存活率≥90%。

6.4 制备过程控制

要求如下：

a) 制备工艺：应基于MEMS技术，采用光刻、模压（PDMS芯片）或蚀刻（硼硅玻璃芯片）工艺制备，制备环境洁净度应达到Class 5；

b) 后处理：PDMS芯片应经等离子体亲水处理，硼硅玻璃芯片应经高压蒸汽灭菌（121℃，20min），所有芯片出厂前应通过结构参数及性能检测。

7 培养要求

7.1 试剂要求

7.1.1 基础试剂

基础试剂应满足V0生长的营养供给及操作需求，具体要求见表2。

表2 基础试剂

试剂名称	技术要求
OM	葡萄糖 5.5~25mmol/L, 谷氨酰胺 1~4mmol/L
FBS	热灭活（56℃，30min），无菌（菌落总数≤10CFU/mL）
PBS 缓冲液	pH7.2~7.4, 渗透压 280~320 mOsm/kg
胰蛋白酶	活性 1:250（25℃时 1min 内细胞消化率≥90%）

7.1.2 血管诱导因子

血管诱导因子具体要求见表3。

表3 血管诱导因子要求

因子名称	浓度要求	纯度要求	储存条件
VEGF	50~100ng/mL	≥95% (RP-HPLC 法检测)	-80℃±5℃避光储存
bFGF	20~50ng/mL	≥95% (RP-HPLC 法检测)	-80℃±5℃避光储存

7.2 仪器设备要求

仪器设备应满足培养环境控制、流体操控及观测需求，具体参数见表4。

表4 仪器设备要求

设备名称	技术参数
CO ₂ 培养箱	温度 37℃±0.5℃, CO ₂ 浓度 5%±0.5%, 湿度≥95%
微流控泵系统	流速范围 1~100 μL/h, 精度±5%
倒置显微镜	分辨率≥0.2 μm, 放大倍数 10×~40×

设备名称	技术参数
生物安全柜	洁净度 Class 5
细胞计数仪	符合 GB/T 39730 的规定

7.3 培养操作流程

7.3.1 细胞接种

细胞接种流程如下：

a) 细胞准备：器官特异性干细胞密度调整为 $1 \times 10^4 \sim 5 \times 10^4 \text{ cells/cm}^2$ （按培养室底面积计算），血管内皮细胞密度调整为 $5 \times 10^3 \sim 2 \times 10^4 \text{ cells/cm}^2$ ，与干细胞比例控制在1:2~1:5；

b) 接种方式：通过微流控泵将细胞悬液精准注入培养室，每培养室注入量偏差≤5%（通过荧光染料标记+酶标仪检测验证），接种后将芯片置于CO₂培养箱平衡30min。

7.3.2 分阶段培养控制

培养周期为28d，分4个阶段控制，具体要求见表5。

表5 分阶段培养参数要求

培养阶段	持续时间	培养基更换频率	流速控制（μL/h）	监测指标
细胞贴壁期	0~24h	不更换	5	细胞贴壁率≥80%（台盼蓝染色）
类器官形成期	1~7d	每2d更换1次	10	类器官直径 100~300 μm
血管化诱导期	8~14d	每1d更换1次	20	CD31 阳性血管结构占比≥10%
成熟维持期	15~28d	每2d更换1次	15	血管结构稳定性≥7d（无明显降解）

8 质量控制要求

8.1 原材料质量控制

要求如下：

a) 芯片：每批次随机抽取5%（最少3个）样本，检测材质、结构参数及性能，合格率应达到100%；

b) 试剂：OM、FBS每批次检测关键成分，不合格批次应不得使用，血管诱导因子每批次检测纯度，纯度<95%时应更换批次。

8.2 过程质量控制

要求如下：

a) 细胞接种质量：接种后随机选取10个培养室，通过细胞计数仪检测细胞密度，变异系数应≤5%；

b) 培养环境监控：每日记录CO₂培养箱温度、湿度、CO₂浓度，微流控泵流速，异常时应停机排查；

c) 阶段监测：每个培养阶段结束后，按表5要求检测关键指标，未达标时应调整培养参数。

8.3 成品质量控制

V0培养完成后（28d），应检测以下指标：

a) 形态完整性：V0直径150~350 μm，无明显破裂或团聚（倒置显微镜观察）；

b) 血管化程度：CD31阳性血管结构占比≥15%，血管分支点数量≥5个/V0（Imaris 软件分析）；

c) 功能活性：目标器官功能指标达标。

9 人员要求

9.1 资质要求

人员资质应满足以下要求：

- a) 应具备生物医学、细胞生物学或生物工程相关专业本科及以上学历，或具备3年以上类器官培养/微流控技术操作经验；
- b) 应通过生物安全培训，取得生物安全柜操作资质；
- c) 应熟悉本文件技术要求及相关仪器的操作规程。

9.2 技能要求

技能要求如下：

- a) 应掌握细胞复苏、传代、计数技能，能精准调整干细胞与血管内皮细胞密度比例；
- b) 应熟练操作微流控系统，可设置流速参数、排查流体堵塞等常见故障；
- c) 具备VO形态观察及数据分析能力，能通过显微镜识别VO生长异常，并使用ImageJ、CellProfiler等软件分析血管化指标。

9.3 培训与考核

培训与考核要求如下：

- a) 每年度参加技术更新培训，内容包括微流控芯片技术进展、VO培养优化方法等；
- b) 每半年进行1次操作考核（含细胞接种精度、仪器校准、应急处理），考核不合格者应重新培训，合格后方可上岗。

10 环境要求

10.1 核心培养环境

10.1.1 无菌环境

应符合GB 19489规定。

10.1.2 洁净度

洁净室等级不低于Class 7，生物安全柜内洁净度为Class 5。

10.1.3 水质要求

应符合GB/T 6682中一级水的规定。

10.1.4 温湿度控制

培养室温度应为 $23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ，相对湿度 $40\% \sim 60\%$ ，CO₂培养箱内温度应为 $37^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ ，相对湿度 $\geq 95\%$ ，CO₂浓度 $5\% \pm 0.5\%$ 。

10.2 辅助环境

10.2.1 芯片制备/储存环境

要求如下：

- a) 制备环境：洁净度Class 5，温度 $20 \sim 25^{\circ}\text{C}$ ，相对湿度 $30\% \sim 50\%$ ；
- b) 储存环境：芯片避光、干燥储存（相对湿度 $\leq 30\%$ ）， $-20^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ 条件下有效期12个月。

10.2.2 试剂储存环境

要求如下：

- a) 培养基、FBS： $2 \sim 8^{\circ}\text{C}$ 冷藏储存，有效期按说明书（一般不超过6个月）；
- b) VEGF、bFGF： $-80^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ 冷冻储存，避免反复冻融；
- c) 胰蛋白酶： $-20^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ 储存，解冻后 $2 \sim 8^{\circ}\text{C}$ 保存，7d内使用完毕。

10.3 环境监测

要求如下：

- a) 每日记录洁净室、培养室的温湿度，CO₂培养箱的温度、CO₂浓度；
- b) 每月检测1次洁净室浮游菌浓度（按照GB/T 16293的规定进行）、一级水水质（按照GB/T 6682的规定进行）；
- c) 每季度校准1次温湿度记录仪、CO₂传感器。

11 安全要求

11.1 生物安全

要求如下：

- a) 所有细胞操作应在生物安全柜内进行，操作前后应用75%乙醇擦拭台面，紫外消毒30min；
- b) 生物废弃物应装入专用医疗废弃物袋，经高压蒸汽灭菌（121℃，30min）后按医疗废弃物处理规范处置；
- c) 若发生细胞泄漏，应立即用含0.5%次氯酸钠的溶液擦拭污染区域，通风30min后再进行后续操作。

11.2 化学品安全

要求如下：

- a) 试剂分类储存：有毒试剂与细胞因子、培养基分开存放，标识清晰；
- b) 操作防护：配制胰蛋白酶、VEGF溶液时应佩戴无菌手套、护目镜，避免试剂接触皮肤或吸入；
- c) 应急处理：若试剂溅到皮肤，应立即用大量生理盐水冲洗；溅入眼睛，立即用洗眼器冲洗15min并及时就医。

11.3 设备安全

要求如下：

- a) 仪器校准：CO₂培养箱、微流控泵每季度校准1次（按设备说明书），倒置显微镜应按照JJF 1402的规定每年校准1次；
- b) 电气安全：应符合GB 9706.1的规定；
- c) 生物安全柜维护：每6个月按YY/T 1540进行核查，过滤器失效时及时更换。

11.4 记录与追溯

要求如下：

- a) 建立安全操作记录台账，内容包括生物废弃物处置、化学品使用、仪器故障及处理情况；
 - b) 记录保存期限≥3年，便于追溯安全事件原因；
 - c) 每季度开展安全隐患排查，形成排查报告，及时整改发现的问题。
-