# 细胞培养技术注意事项大汇总

1. 实验进行前，无菌室及无菌操作台(laminar flow) 以紫外灯照射30-60 分钟灭菌，以70 %ethanol 擦拭无菌操作抬面，并开启无菌操作台风扇运转10 分钟后，才开始实验操作。每次操作只处理一株细胞株，且即使培养基相同亦不共享培养基，以避免失误混淆或细胞间污染。实验完毕后，将实验物品带出工作台，以70 % ethanol 擦拭无菌操作抬面。操作间隔应让无菌操作台运转10 分钟以上后，再进行下一个细胞株之操作。

2. 无菌操作工作区域应保持清洁及宽敞，必要物品，例如试管架、吸管吸取器或吸管盒等可以暂时放置，其它实验用品用完即应移出，以利于气流之流通。实验用品以 70 % ethanol 擦拭后才带入无菌操作台内。实验操作应在抬面之中央无菌区域，勿在边缘之非无菌区域操作。

3. 小心取用无菌之实验物品，避免造成污染。勿碰触吸管尖头部或是容器瓶口，亦不要在打开之容器正上方操作实验。容器打开后，以手夹住瓶盖并握住瓶身，倾斜约45° 角取用，尽量勿将瓶盖盖口朝上放置桌面。

4. 工作人员应注意自身之安全，须穿戴实验衣及手套后才进行实验。对于来自人类或是病毒感染之细胞株应特别小心操作，并选择适当等级之无菌操作台(至少 Class II)。操作过程中，应避免引起aerosol 之产生，小心\*\*\*\*，例如DMSO 及TPA 等，并避免尖锐针头之伤害等。

5. 定期检测下列项目： 5.1. CO2 钢瓶之CO2压力 5.2. CO2 培养箱之CO2浓度、温度、及水盘是否有污染(水盘的水用无菌水，每周更换)。 5.3. 无菌操作台内之airflow 压力，定期更换紫外线灯管及HEPA 过滤膜，预滤网(300小时/预滤网，3000 小时/HEPA)。

6. 水槽可添加消毒剂(Zephrin 1:750)，定期更换水槽的水

请问工作浓度的胰酶是不是应保存在-20度?如果放在4度冰箱可以保存多久呢?是不是几个小时就会失去活性?

平时放在-20度，分装在50毫升螺口管，用时拿一管放4度用。

1. 认真按照操作规程进行实验，一般不大会导致污染，很多情况下是由于所用的试剂或培养基有污染而使实验失败，

2. 粉末培养基配制好后(加了血清)，一般在4度尽量不要超过1个月，如在-20度存放时间可长一些，但最好也不要超过3-4个月，可能对于永生化细胞株来说要求不是太高，但我在过去的4年里一直是作原代 细胞培养 的，细胞娇弱，经验表明放置时间不宜过长。

3. 关于实验用品的清洗与消毒，我的经验是：用过的玻璃器皿先在清水中浸泡30min以上，然后加少许清洗剂，以超声波洗涤30min左右，(如无超声波洗涤器可用软毛刷轻轻刷洗干净)，捞出晾干，再在铬酸洗液中浸泡6-18h(或过夜)后，自来水清洗10-15遍，双蒸水清洗3-4遍，晾干，高压消毒后即可使用。

许多塑料制品也可以高压消毒，例如培养瓶盖，胶塞，吸头等。不能用于高压的一般均已制成一次性作用的商品了，当然如果 money有限，如进口的培养板、皿等，也可以重复使用1-2次，我当时使用方法是将其完全清洁后，使用前在紫外灯下敞开照射1-1.5h即可，我做过多次，没有出现问题。塑料培养瓶由于清洗消毒不便，最好不要重复使用，如一定要重复用，可用环氧乙烷等消毒，(消毒后一定要放置半年以上方可使用)

在光镜下，上皮细胞通常呈“铺路石”样排布，细胞之间有拉丝现象(即距离较远的细胞可以通过细长的触手相连)，细胞有成片生长的特性。而间质细胞通常呈梭形，没有有成片生长的特性，细胞之间的联系不紧密。但是细胞的形态特征会因为生长条件的改变而改变，如HeLa细胞是上皮细胞，但是在酸性培养条件下会变为梭形。