

细胞实验室规章制度

一、细胞生物实验室准入细则

1. 细胞生物学实验需由申请人提交书面报告（附件1），经导师同意、签字后递交到细胞生物实验室管理人员方可进行；每次可申请实验的有效期为一个学期及其后的一个假期，有效期结束，如需继续实验，需要再次提交书面报告；
2. 没有经过实验室内细胞培养培训的学生，需接受培训并考核通过后才能正式开始实验；有细胞培养基础则可选择是否参加，但必须参加考核(需填写递交附件2)；培训由实验室统一进行，每学期一次，时间约1个月，培训结束后统一组织考核，考核不合格者可在两周后重新约时间进行考核，若三次考核不通过，需重新进行培训直到考核通过为止；培训申请需提交申请表格（附件3）；
3. 以上表格需要在新学期的第一周内提交，错过时间的学生，需要等待下一次申请或培训时间；
4. 实验室统一分配物品柜、培养箱、冰箱等资源的使用位置，安排值日，实验人员应服从统一安排（有特殊情况者可进行协调），并遵循实验室规章制度；自备实验服和拖鞋；
5. 每次实验结束（附件1中申请的结束时间），收到管理人员通知三天内，需自觉办理出细胞房手续，归还柜钥匙，清理培养箱及冰箱内物品，然后由管理人员作相关检查。未经上述程序，直接离开的，则该学生导师所带的其它学生（或该生所在的课题组）暂停所有细胞实验。

二、常规操作

1. 穿着细胞房专用实验服。自己的白大衣，可挂在门外的衣柜上；
2. 穿着专用拖鞋。进入细胞房前需先脱鞋置于鞋架上，摆放整齐，更换各自在细胞培养室内的专用拖鞋，尽量避免在缓冲间走动、停留，细胞房专用工作拖鞋不得穿出细胞房，细胞房专用拖鞋每个月组织清洗一次；
3. 进入细胞房后请随手关门，禁止把门栓拧出阻止门自动锁上，缓冲间的两扇门不可同时开启。
4. 不得在细胞房内喧哗、打闹、饮食，不得随便乱动他人物品。公用物品使用完毕后，必须清洁后放回原处。
5. 不得随意使用他人物品（包括试剂、耗材、器械等），如需使用须征得对方同意。
6. 每张超净台最多可2个人同时使用。尽量避免在内长时间逗留、交谈；
7. 细胞房公用实验耗材、仪器、试剂等均不可随意带出（包括移液器）。严禁将与细胞操作无关的试剂、耗材带入细胞房内，必要物品带入后需用75%酒精棉擦拭，进行表面消毒；使用完毕后需要及时带离细胞房；
8. 放置于冰箱、培养箱等实验室公共场所的个人实验用品（如试剂、细胞等），必须注明所有者姓名、物品名称、配制时间、有效时间等；若发现标注不规范，群上公示24小时后未做出处理则丢弃处置。
9. 实验完毕后，立即清理实验垃圾：废液倒入废液收集瓶，其余的全部置于垃圾箱。计数板和盖玻片冲洗干净，用纸巾吸干后放回原处。

10. 实验室提供的实验细胞株不能带离本实验室，如确有需要，由课题负责人或导师向实验室管理人员提出要求。
11. 为维护良好的实验环境，严禁带无关人员及未经培训的人员进入，如确实需要，必须经实验室负责人同意；严禁携带非实验用品和危险物品入内，如确实需要，必须经实验室负责人同意。
12. 每周组织一次实验室大扫除，所有进入细胞实验室实验的学生分组，按照值日表进行。

三、仪器的使用

1. 首次使用仪器时，必须征得实验室管理人员同意后，在其指导下熟练掌握并通过考核后，方可进行独立操作；仪器使用时严格按照操作规程进行。
2. 每次使用仪器后，都要做好仪器使用情况记录。开始使用时或使用过程中出现故障，应及时向管理人员报告，不能自行拆卸修理。如果不报告，将取消其仪器使用资格。
3. 要爱护仪器，使用中细心操作，防止溶液污染仪器，一旦污染，应及时通知负责老师并及时处理；同时要作好自身防护工作，以免中毒、受伤。

四、培养箱使用规范

1. 恒温培养箱的电源永远保持接通显示状态，正常显示为：37℃ 5% CO₂；
2. 从培养箱取放物品前，需用酒精清洁双手（或手套），尽量缩短开门时间和减少开门次数。
※培养箱中的空气是经过过滤的洁净空气。长时间敞开或频繁开关培养箱，容易造成污染。
3. 培养瓶、皿放入培养箱前，先用酒精消毒表面，并稍等至酒精挥发后再放入，以免培养箱内滞留过多乙醇蒸气。
4. 2-3 人共用一层培养箱，按预定位置摆放培养器皿，方便查找，以免长时间敞开培养箱。
5. 普通培养中的细胞，若非实验特别需要，通常每瓶/板细胞每天只需要观察生长状态一次，故 2 人以上共用的细胞，建议约好时间一起观察。
※频繁将细胞拿出观察，容易给培养箱造成污染，同时也会影响细胞生长条件的恒定。
6. 培养箱内所养的细胞须清楚注明细胞名称、培养人姓名和培养日期，禁止将细胞置于细胞培养箱内不管；若发现未标注或标注不清的，群上通告一次后仍未作处理的，隔日将作丢弃处理；
7. 未经许可，不得随便使用和丢弃他人细胞、其他实验室的试剂、耗材，如需使用，务必得到持有人许可；否则，取消该生细胞实验资格，并在中心通报批评。

五、显微镜使用规范

1. 显微镜使用前，可用酒精棉从中间至周围擦拭载物台。
2. 显微镜的使用：调节光亮度的旋钮调到最小（防止瞬间电流过大导致灯泡烧毁）→打开开关→使用→调节光亮度的旋钮调到最小→关闭开关；注意事项：**A**：要注意不要划伤镜头；**B**：如果有液体等东西弄污了镜头或其他部位，要立即用擦镜纸或棉球擦干，用无水乙醇清洁。
3. 离开细胞房时或较长时间不需使用时，及时关上电源，延长灯泡寿命；较短时间不用时，可

调节光亮度的旋钮调到最小，尽量避免频繁开关显微镜电源。

4. 每次实验完毕后，必须确保显微镜已关闭后，方可离开细胞房。对于两台大型荧光显微镜，使用完毕后必须进行使用登记。

六、超净台相关操作规范

1. 为避免使用时间冲突，超净台使用遵循预约原则。使用前需提前在细胞房门前的预约本上依次申请预约，注明使用人、使用时长等。超过预约时间 30 分钟仍未使用者视为放弃本次预约，需重新预约；
※无预约者若有必要在他人预约时段内使用，需先征得预约者的同意，否则应无条件让出工作台，以免耽误他人实验。
2. 实验开始前 30 分钟，将实验所需的器械、耗材、消毒棉球、试管架等物品放入台内，超净台内不得放置与本次实验无关物品，关上玻璃门打开紫外线照射半小时后，关闭紫外灯，打开工作台风机和日光灯开始工作。紫外灯照射时间不得超过 30 分钟；为延长紫外灯管的使用寿命和加快超净台使用的轮转速度，紫外灭菌时间超过 45 分钟仍未使用者（从预约时间开始计算），除特殊情况外，视为放弃超净台的使用，需重新预约，后面预约的人员可优先使用该超净台。
3. 实验顺序：先做绝对无菌的实验，再做可疑污染的实验，最后做污染的实验；其次考虑先做生长状态差的细胞，再做生长好的细胞，最后做永生株细胞；
4. 点燃酒精灯前需检查瓶中酒精是否足够，液面应占瓶高 1/3-2/3。
※消毒用 75% 的酒精，分析纯无水乙醇或分析纯 95% 乙醇配制；酒精灯用 95% 的工业酒精。向喷壶或灯内添加酒精时请留意。
※酒精和酒精棉球由值日生负责补给，发现细胞房内存放量不足时请及时通知值日生。
5. 超净台中应摆放废液杯和废品杯各一只，分别存放废液和固体废物；实验结束后将杯内垃圾分别倒入水池（液）或垃圾桶（固）中，并冲洗晾干备用。
※请将废弃的枪头、管子内的残留液体打（倒）入废液杯后再弃入废品杯中，以免垃圾桶内留有大量培养液滋生细菌。

七、实验完毕后的相关操作规范

1. 实验完毕后，立即清理实验垃圾：废液倒入废液收集瓶，其余的全部置于垃圾箱。计数板和盖玻片冲洗干净，用纸巾吸干后放回原处。
2. 可回收的移液管、离心管、培养瓶皿等，放入装有清水的塑料箱中浸泡，箱内需有足量的清水以没过浸泡物品。
※可回收器皿尽可能先取出棉花、撕掉标签纸，并经过初步涮洗后再放入箱内，尤其是培养瓶或血清管中有大量高营养的液体残留时，容易使箱内的清水长菌。
※保证浸泡的瓶、管内完全被清水充满，避免在存在大量空气的情况下被压到箱底。
3. 装培养液的瓶子、配培养液的器皿勿放入塑料桶内浸泡！应由使用者本人及时清洗晾干后放

回柜中备用。

※因桶内物品通常要浸泡几小时以上才送去清洗，此时细菌可能已在桶中生长并释放内毒素。细菌内毒素很难通过常规湿热灭菌步骤去除干净，即使干烤也不能保证其完全失活。内毒素对细胞生长及多种实验均有较大影响。

4. 实验室内不得存放个人物品、耗材，实验完毕后应及时转移至个人储物柜中。

八、值日生工作职责

1. 每周值日生值日时间从周六开始，至下周五结束，每天早上 8:30 至下午 6:00。
2. 值日周开始时需做的事情：在周六、日或之前，配制消毒用的 75% 的酒精，制作酒精棉球，给细胞房内添加足够的 95% 乙醇供酒精灯使用，供未来一周的使用。
※75% 的酒精可用 750ml 95% 的酒精加去离子水 200ml 或 750ml 无水乙醇加去离子水 250ml 配制而成。
3. 值日周内每天需做的事情：
 - a) 值日生每天负责洁净室（309-2）、洗刷间（309-1）和生化检测室（311-1 和 311-2）的检查和锁门工作。若当天有事或有人需实验至较晚的时间，值日生需要交接好，做到人离门锁钥匙次日交还值日生保管；锁门前，填写“值日工作登记本”，值日生本人或吩咐最后离开细胞房的人在确保室内无人后开启臭氧发生器，对细胞房进行消毒，并锁好大门。
 - b) 每天早上把适量次氯酸钠加入废液收集瓶，晚上清空。
 - c) 每天早上，更换垃圾袋；检查培养箱内水量是否足够（切记给培养箱换 MilliQ 水，保证水质清洁）；补充酒精棉球；给酒精灯补充酒精；检查液氮罐液氮存量，存量不足 1/2 时应及时通知负责人；早上 11:00 时进行高温高压消毒灭菌，完毕后转移到烘箱；检查细胞房内酒精等公用试剂、耗材的储备情况。
4. 值日周结束前需完成的事情：星期一和星期四清洗浸泡在洗涤液中的玻璃器皿、离心管。星期五或前后一天内打扫细胞房。包括拖地，擦桌子、清洁和整理抽屉，擦超净台、冰箱及桌上的仪器，给水浴锅加水或换水，洗细胞房专用的实验服和拖鞋。
5. 每 2 周清洁一次培养箱：先将培养箱中的物品取出暂存于超净台内，将培养箱内的不锈钢板取出，用酒精棉球清洁钢板和培养箱内壁，利用超净台紫外灯照射横板；打开培养箱清洁内壁时动作要迅速，避免长时间敞开门使得大量不洁净空气进入，缩短过滤器的寿命；用紫外灯照射培养箱内部 15min，手提紫外灯放入培养箱前要用酒精棉擦拭干净。

九、罚则

1. 违反以上细则 1 次，给予提醒和口头警告；
2. 违反以上细则 2 次，实验室通报批评及通知导师；
3. 违反以上细则 3 次，暂停细胞实验、并取消细胞实验设备预约资格一周；
4. 违反以上细则 4 次或以上，取消其细胞实验资格，需要重新进行培训，重新了解实验室相关规范细则，在重新取得合格认证前不得进入实验室进行细胞实验。

细胞培养室设备操作规范

1. 无菌观念和无菌操作原则：

- 无菌观念 无菌的：A：培养瓶、皿、离心管的内部；
B：巴氏吸管的里面和尖端 2/3，一次性吸管；
C：手术器械的头部；
D：培养液、试剂；
E：超净工作台内吹出的空气已过滤无菌。

有菌的：瓶、皿的外面，器械的手持部分，手、台面、吸管上部外面手持部分等。

无菌操作原则：

- ① 无菌部分接触有菌部位，即刻丢弃；
 - ② 培养瓶在离开超净台前要拧紧，再放入培养箱。无滤膜的培养瓶，则放入前要旋松 1/4 圈，（以便透气）再放入；
 - ③ 所有试剂分装时要注意无菌操作；
 - ④ 标本不一定无菌，做之前要用含抗生素，抗霉菌药的液体冲洗，一般原代培养污染的可能性最大；
 - ⑤ 培养箱内的空气接近无菌，但不是绝对无菌。
2. 移液枪：使用前要先熟悉枪的性能及不同电量和不同吸力档的吸液力度。一般一把电力充足的枪，在最低吸力档的位置就有很强的吸力，在使用时要轻扣吸液按钮，缓慢地吸取液体，严禁液体超过吸管的禁止标志。特别是使用小吸管如 1ml 吸管时更要小心（不能将吸管插到液体的底部，而是要在液面稍下方缓慢的吸液）。插着吸管的移液枪严禁倒置，应侧放或将吸管拔下后放回台面。平时要注意移液枪的电量，当工作时移液枪的手持部位的指示灯（红）闪烁，表示电池低电量，要注意充电。充电原则：深放深充，最好是过夜充。每个工作室内的移液枪不能相互混用。
3. 计数板：血球计数板在使用前先用擦镜纸擦干净，动作要轻柔，避免出现划痕。方法：先将 75% 的乙醇湿润，用擦镜纸轻擦计数板的网格面，直到镜下观察干净为止。之后再擦盖玻片，盖上，镜下观察，干净为止。使用完毕要立刻冲洗干净，晾干，备用。在任何时候都严禁将计数板重叠放置。
4. 普通冰箱：普通冰箱的电源永远保持接通显示状态。在放入或取出物品后要立即迅速关上。严禁长时间开启冰箱门，严禁将冰箱中保存的物品长时间取出，以免影响试剂效价，从而影响实验结果。每半年检测冰箱内温度。
10. 离心机：开机→平衡→放入离心管→调节转速→调节离心时间，开始离心。注意：离心管一定要配平；离心时一定要关盖；如有液体等物质污染离心机要立即吸干，并用 80%~90% 的乙醇清洁。定期清洁（每 15 天一次）。
11. 水浴箱：水浴箱只能使用去离子水，箱内的水面一定要高过加热管，定期换水（30 天换一次），换水时要清洗水浴箱，洗时注意一定要保持控制面板干燥，以免短路损坏水浴箱。
12. 橡皮吸头的保养：不宜在紫外线下照射，禁用乙醇等有机溶剂擦，在阴凉干燥处保存。

13. 配液和分装：A：严格无菌操作；B：同一根吸管不能用于两种不同的液体；C：准确吸出液体，避免吸出后又打回去。
14. 如何避免细胞间的交叉污染：
传播途径：空气、吸管、培养液。
操作注意事项：
(1)同一个吸管，不能连续用于 2 种不同细胞的培养瓶/皿。
(2)接触过有细胞的瓶/皿的吸管，不能再接触其他培养液。
(3)在超净台内，最好同一时间只操作一种细胞的培养瓶。
(4)吸管尾部一定要塞有棉花。
操作顺序：先：生长慢的细胞； 再：生长快的细胞； 后：永生株细胞
15. 超低温冰箱：超低温冰箱的电源永远保持接通显示状态，正常显示为 -75°C ~ -85°C ；高于 -70°C 则自动报警。使用原则：打开→取出或放入物品→立即迅速关闭，开启箱门时间一定不能超过 20 秒（除霜时不能超过 2 分钟），尽量减少开门次数。
16. CO_2 压力流量表：压力表表示 CO_2 瓶里的气体量，压力范围为 0~25；一瓶满的气体其压力为 5~12 左右，当压力表显示小于 2 时就要注意要更换气瓶。流量表的范围为：0~1 是气流量的指示标志，我们要求的气体流量为 0~0.2 之间，不能超过此范围。调节方法见实际操作。
17. 液氮：应根据实际细胞贮量，确保液氮将细胞完全淹没。操作时一定要注意安全，避免冻伤，防止爆炸。