

回顾

1. 显微镜的“专业”操作。

标准的生物科研绘图。

2. 暗视野下神奇的世界。

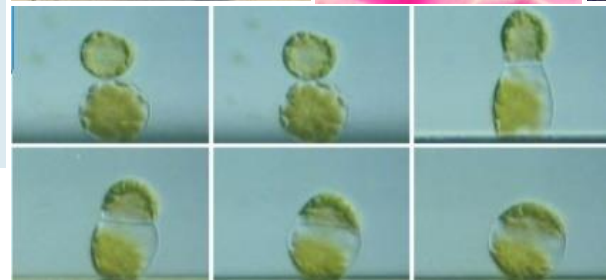
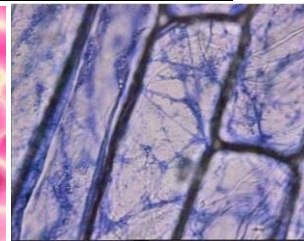
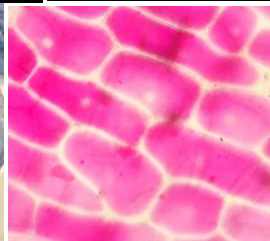
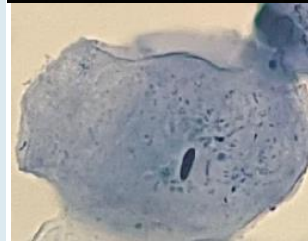
3. **染色**：①詹纳斯绿B染色

②中性红染色

③考马斯亮蓝染色

4. **选择透过性**：单盲、双盲、阳性对照、阴性对照。误差的产生、组内重复、组间差异和组内差异。

5. **流动性**：单细胞获得的方法、细胞融合的方法及应用

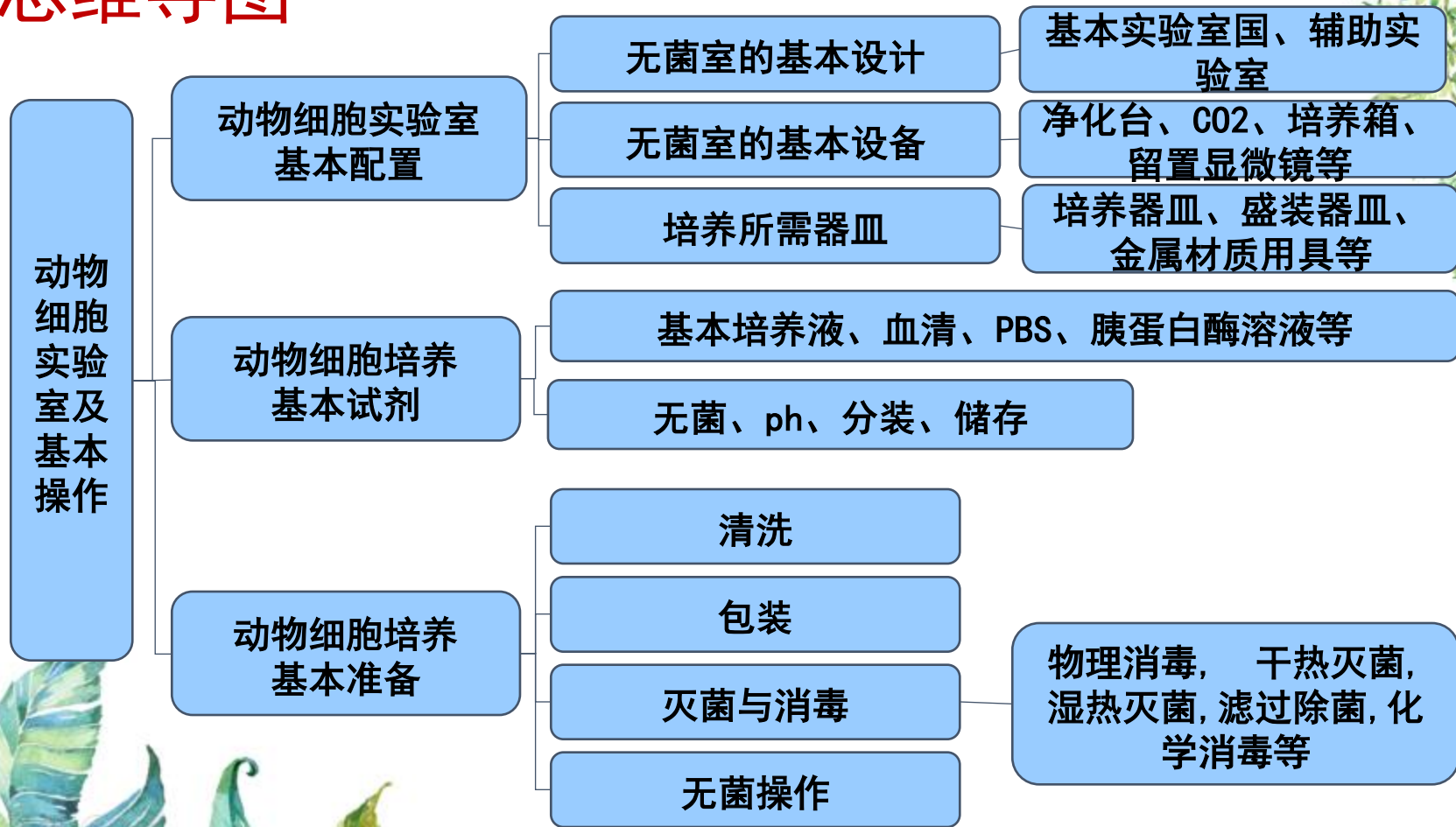


序号	实验名称	实验内容
七	动物细胞培养的无菌化准备	理论（无菌操作的仪器、清洗、试剂） +操作（清洗）
八	动物细胞传代培养的虚拟仿真 实训	理论（细胞培养的传代） +操作（传代实训）
无菌室集中上课周		
七	动物细胞培养的无菌化准备	理论（无菌操作消杀）+操作（消杀）
九	动物贴壁细胞的复苏	复苏
十	动物贴壁细胞的传代培养	传代
十一	动物贴壁细胞的冻存	冻存



实验七 动物细胞培养的无菌化操作

思维导图



一、实验目的



- (1) 掌握动物细胞培养室的基本设置和仪器配置。
- (2) 了解动物细胞培养相关的试剂。
- (3) 掌握细胞培养无菌化准备流程：房间，仪器，试剂。





二、实验原理

- 无菌操作技术是细胞工程相关技术操作中的重要实验条件，只有在无菌的条件下，才能正确的模拟动物细胞、组织、器官等生物学材料正常生长、发育、改造所需的各种环境。
- 无菌操作，是指在无菌室或超净台中进行以防止微生物进入人体或污染供试菌的操作技术。
- 无菌操作是各种生物实验和生产实践中一项重要的基本操作。
- 无菌操作的要求是：操作前将操作空间中的细菌和病毒等微生物杀灭；操作过程中保证操作空间与外界隔离，避免微生物的侵入。



三、实验试剂及器械

- (1) 试剂：洁而灭、甲酚皂，现配现用。
- (2) 仪器：倒置显微镜、二氧化碳恒温培养箱、超净工作台等
- (3) 器皿：滴管、离心管
- (4) 自制酒精棉球



第一次课：完成器皿清洗工作



- ① 使用过的培养用品应立即浸入清水，加入洗涤剂，避免干涸难洗。
- ② 清洗玻璃器皿，自来水清洗数遍，倒置自然干燥。
- ③ 浸酸性洗液，浸没，**过夜**。
- ④ 从酸性洗液捞出后，自来水冲洗**10-15次**去除残余酸液，去离子水涮洗5次。
- ⑤ 倒置烘干。
- ⑥ **包装(牛皮纸或医用饭盒)。**
- ⑦ **灭菌，贮存备用。**

第二次课：操作台准备，无菌室无菌化，器皿灭菌



定员一名同学

(1) 每个无菌室配备	酒精灯（检查灯芯和酒精是否合格，内外各1）	2
	试管架（内外各1）	2
	酒精棉球瓶（带到准备室，补充酒精棉球）	2
	细胞培养瓶（车）	1条
	PE手套（车）	1袋
	大镊子（台子）	1
	95%酒精（车）	1
	打火机（台子）	1
	记号笔（车）	1



(2) 无菌室的无菌化（橡胶手套即可）

- ① 配置洁儿灭，两次擦拭分别配置新的溶液，四分之一盆即可。
- ② 清洁纱布沾取洁而灭第一次擦拭，除灰。
- ③ 第二次擦拭，消毒，开启操作台紫外灯。
- ④ 甲酚皂清理地面：最后结尾工作，擦拭二次，分别由里至外，不要反复，开启所有房间紫外灯。

擦拭顺序：

- ① 先超净台内部（绝对优先）到外部的顺序；
- ② 无菌室内一切可触碰到的台面；
- ③ 仪器：倒置显微镜、离心机，绝对少水，勿擦拭电子元件；
- ④ 二氧化碳培养箱需要单独擦拭，先内后外的原则。

(3) 包装

- 定员2名同学，**无菌室取出台面的饭盒和酒精棉球瓶，均2个。**
- ① 桌面铺牛皮纸，戴PE手套（不可随意抓取环境物品）。
- ② 滴管，加脱脂棉球，加胶头，同方向装满饭盒2个，盖严盖。
- ③ 离心管同方向装满饭盒1个，外加10个冻存管。
- ④ **饭盒上有标记，勿交叉使用，准备完毕后，及时送至灭菌锅（准备室和灭菌室）。**
- ④ 全部完毕后，制作脱脂棉球2瓶：棉球大小合适，酒精勿多。



(4) 湿热灭菌后，移入无菌室缓冲间，紫外照射30min，操作前酒精擦拭饭盒和酒精棉球外部瓶（各2个），移入无菌室。

①首先查看高压锅内的水是否充足，放入物品盖好盖。

②加热灭菌锅。将放气阀打开，放气5—10 min，以排除锅内的冷空气。

③落下放气阀继续升温升压，玻璃器皿等用15磅(121℃)30 min，胶塞、塑料制品、溶液等可用10磅(115℃)20 min。

④停止加热，待压力自然下降至0再打开放气阀排汽，开盖，取出高压灭菌的物品烘干。

五、注意事项

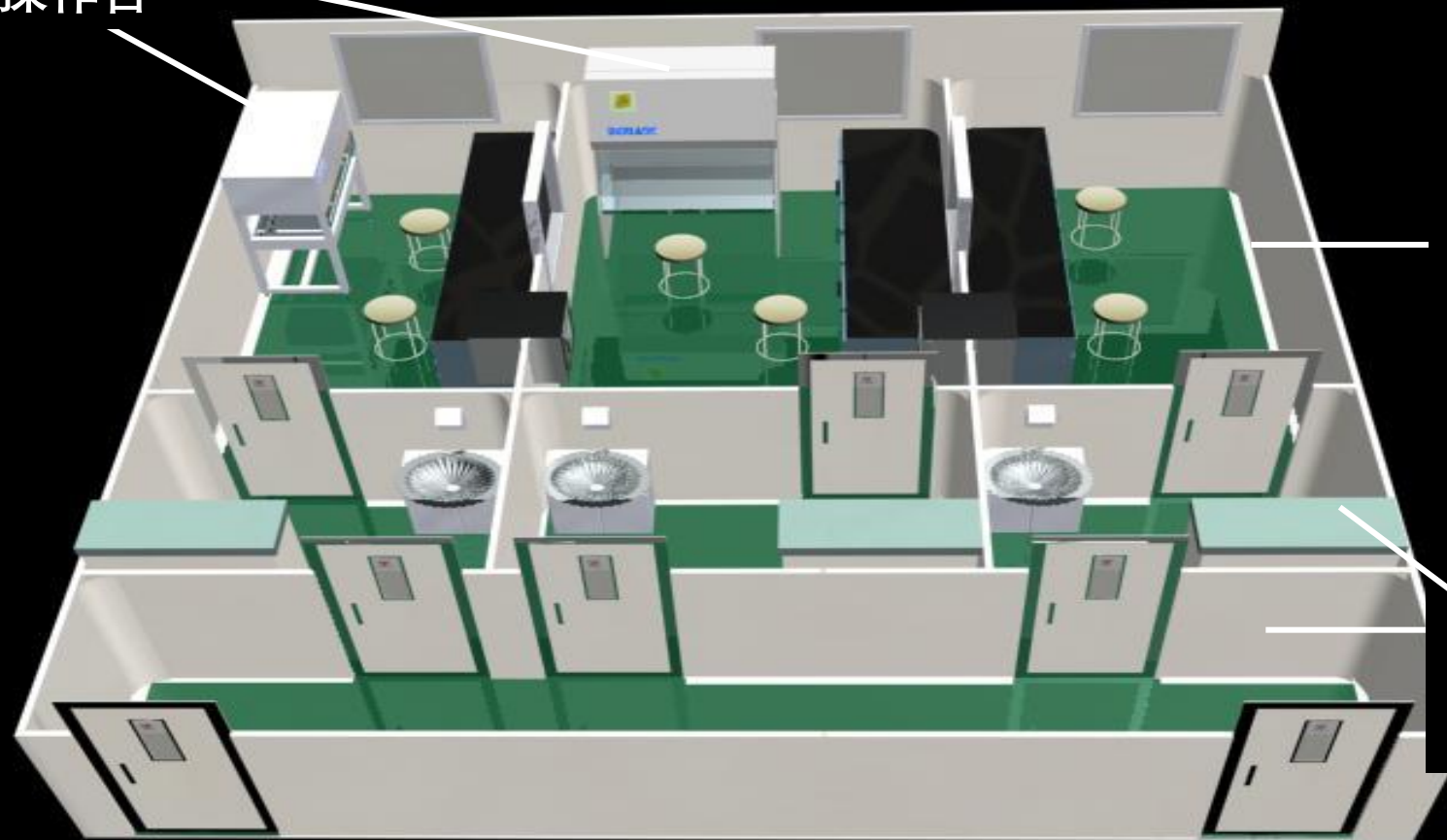
- 注意用酸安全，清洗彻底，勿徒手拿浸酸后的器皿；
- 房间打扫彻底，紫外照射。
- 包装时，注意带手套，勿恣意聊天。
- 注意灭菌锅水位！
- 酒精棉球大小合适，酒精切勿过多。
- 按组操作，严格按照进出无菌室要求操作。



- 认真听课！并把听到的内容用起来！
- 无菌室的门！
- 无菌室不能留垃圾！



无菌操作台



接种区

缓冲准备区

六、作业

① 记录无菌化准备的基本流程，试写出可行性技术路线图；

注意：两次课（8学时），一次报告册

