**國立臺灣大學 分子生醫影像研究中心**

**分子探針合成核心實驗室 使用者資格認證辦法**

**第一章 基本實驗室守則**

**1.1實驗室工作的態度**

 進實驗室就像進入社會工作，一些差別是這裡不是以營利為主，而且這份工作需要時時學習新知，但學習是過程而不是結果。最終著重的是要做出新的科學成果。做研究與過去求學念書是不一樣，如果你進了實驗室，隨興的學生心態 (等著人來教，翹課) 還是很重的話，請丟棄這樣的態度，念書是你個人的事，你可以說我有七十分可以過就好，教授也懶得理你拿幾分，在實驗室裡，是團體工作，教授是領導人，你就是要做到教授的要求。這裡是真正的工作場合。

**1.2實驗室安全**

 實驗室安全是實驗室最重要的考慮。實驗室是有潛在的危險性，遵守該有的規則，並且有好的判斷，是安全的。就像馬路一樣，馬路可以如虎口，你必須遵守交通規則，該帶安全帽時就戴安全帽，還是能行車平安，到達目的地。

 身為第一線在實驗室工作的人員，一定要負起實驗室安全的責任，保持警覺性，危險的操作，是可以危及人身生命的，不只是個人，還有實驗室其他人的安全。不同研究方法有不同的安全需知，請務必先了解再操作。

**1.2.1化學安全**

 使用化學藥品務必先查詢過他的 MSDS, 知道危險性，選擇適合的操作方式。並且將 MSDS 印出來，根據 alphabatic order 放在的 file cabinet, 知道如何處理該化綱藥品與丟棄，才能始用。

實驗室會接觸到幾個比較危險性的藥品:

1. 甲醛 (formaldehyde, 福馬林 paraformaldehyde) 和戊二醛 (glutaraldehyde): 他們對蛋白質能產生交聯的作用，所以有致癌的可能性。並且它們有某種程度的揮發性，操作時務必在化學安全櫃內操作，穿實驗衣，戴手套。若有溢出的話，可用氨水或者尿素來中和。丟棄時，請集中丟棄在同一個廢液瓶。

2. 丙烯醯胺 (acrylamide): 這有神經毒，也有可能致癌，操作時務必戴手套，穿實驗衣，還有將操作範圍集中在一個區域，雖無揮發危險，且前實驗室是在化學安全櫃操作。做完之後，用紙巾沾水，擦拭三次以上。而做實驗過程，避免帶著手套去碰觸其他地方。若有需要，可以用保鮮膜保護其它可能需要碰觸的地方，做完實驗後再丟棄。

3. 甲苯 (Toluene): 吸入過多會造成頭痛，因此必需帶安全眼鏡或護目面罩與手套，在通風良好的地方操作 (最好是化學安全櫃)。甲苯是很好的溶劑，避免與塑膠一起使用。 (時間短暫，如需吸取定量使用微量吸管，可用塑膠 pipette tip, 但也可以前接玻璃 pipette，但避免伸入大罐的 Stock Bottle。

4. 三氯甲烷，又稱為氯仿 (Chloroform): 三氯甲烷為一安定、不易燃、易揮發且對心臟血管產生仰制作用之毒性液體。一定要放在可燃物的化學安全櫃，戴手套(甚至 最好雙層)，實驗衣與安全眼鏡或臉罩。

**1.2.2氣體安全**

 氣體瓶一定，一定要固定住。搬運時，請問有經驗的人。高壓氣體瓶如果倒了，可以變得像炸彈，可打穿實驗室的牆，衝擊力會致命的。

**1.2.3雷射安全**

 請務必讓人知道有雷射開著。紅外線雷射是看不到的，沒用的時候，一定要關起來。

**1.2.4機械安全**

 操作任何電動機械，要戴安全眼鏡。

**1.3實驗室禮儀**

 實驗室是個工作的環境，雖然實驗室裡強調學習的能力，但並不是個學校。請保持敬業的態度和基本的職場禮儀來實驗室工作。

 實驗室資源與知識是共享的，所有的人都應該互相幫忙，讓實驗室順利進行。大家在請求幫忙時，要尊重對方時間的調配。

 維持實驗室在一個具生產力的狀態是每個人的責任: 大家要自動自發樂於負責，分擔公共服務，維持實驗室運作，提出能改進實驗室的建議。如果你不願意承擔這樣的責任，那你可能就是實驗室的問題。

 發現問題，一定要報告，最好還能提出解決方法。

 東西快用完時，一定要提前訂貨，有些樣品需要兩三個月的交期。訂東西要負責，多詢價為實驗室省錢，訂單出去，要追蹤到貨進來為止。

 做完實驗一定要將實驗桌清乾淨。所有的玻璃器具用完就要洗乾淨，晾乾。晾乾後，放入櫃子裡。

 實驗記錄本記載要詳細精確。不同人做有相同的再現性。而這些記錄在將來寫論文，給演講或申請專利都是很重要的資料。實驗室是個讓大家發展、合作、共同學習的環境，所以需要大家都要在創造這樣的環境上貢獻和參與。

**1.4 標示**

 所有的人在自已的樣品上至少要標上自己的名字或者寫上可判斷為誰的英文字母縮寫，樣品內容以及製作樣品的日期。

 請幫實驗室所有的儀器及物品貼實驗室標簽。

 如果實驗室抽屜有標示不清，也幫忙標示。

**1.5 實驗記錄本**

 實驗記錄本是培養好的工作習慣的基本。有良好的記錄能保護自己的專利，能確保別人能再現實驗而避免 fraud. 能幫助寫 paper 和報告。有記錄才能 validate 你的研究。

 勿用活頁紙或鉛筆記錄。所內可領取免費且好用的實驗記錄本。封面上標示自己的名字，記錄本的時間，聯絡方法。

 按照時間記錄，實驗目的，過程與結果都應該在上面。若有圖片，也該印出用膠水黏上。影片檔則要記錄在硬碟的目錄與檔名。

 任何討論，主意與觀察都寫在上面。

 不時要翻舊的記錄，記憶有時會誤導判斷。每隔一陣子，將精華做成 power point 寄給老師。

 實驗記錄本是實驗室的資產，離開實驗室時，需將實驗記錄本留在實驗室。

**1.6 垃圾分類**

 務必落實垃圾分類，否則可能有安全上顧慮且實驗室會被罰款。

針頭，針筒

玻璃: 自製的玻璃微流體裝置，先以熱水泡過後，將針筒與玻璃拆開後分開丟棄。實驗室廢棄物: tips, tubes, dishes, ...

一般垃圾: 紙，鋁箔紙 ...

生物廢棄 Biohazards, 細菌與細胞廢棄物。

化學廢棄物: 分為有機，酸，鹼，acrylamide-containing chemical, aldehyde-containing chemicals.

**我已詳盡閱讀以上守則，並願意遵守規定**

使用者 : \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_

日 期 : \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_

認證者 : \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_

**第二章 實驗室安全**

**2.1一般守則**

 在安全防護上是幾乎不可能訂出一套守則可涵蓋所有可能在實驗室發生之危險狀況，因些僅列舉一些一般性的守則以供參考，以減少在實驗室工作之危險！請使用都務必遵守。

 在實驗室工作時必須確切地了解每一個動作可能發生的危險及應採取之安全防護工作。

 善加使用一些防護設備如眼鏡、手套等等。

 有毒物質一定要在 fume hood 中操作。

 隱形眼鏡可能會讓化學品附著以致傷害眼睛，因此不要使用。

 在工作的區域應保持清潔。

 所有化學品應詳加標示。

 使用化學品後雙手需洗淨方能飲食或抽煙。

 處理廢棄物時應遵守有關廢棄物處理之規定。

 熟悉緊急應變的步驟及工作區域之緊急應變設備(如滅火器，逃生呼吸器等)之放置位置。

 實驗室之同一房間，不管任何時間必須要有至少兩人在其中作實驗或協助

**2.2防護設備**

 實驗室最常見之防護設備為 fume hood, 因些在使用 fume hood 時需注意以下幾點 :

* 工作時 fume hood 上的防護璃罩須拉下至適當的位置。
* 可用無塵紙置於抽風口看 fume hood 是否正在運作。
* 不要將不必要的物品置於 fume hood 內，以至造成排氣量的減少。
* 當 fume hood 有操作不正常時請即與負責技術員聯絡。
* 使用完畢後請保持 fume hood 中的整潔。

 第二個常用的緊急防護設備為緊急淋浴器及洗眼器，也請注意以下的幾點事項 :

* 請熟悉它的位置及使用方法。
* 請勿放置物品在緊急淋浴器及洗眼器的附近阻礙通行。
* 實驗室的負責技術員應定期檢查它們是否操作正常。

 儲存 :

* 估計存量不要放置太多。
* 可燃 / 易燃性化學品存放在適當儲存位置。
* 可然 / 易然性化學品不可與紙、塑膠類及產生高溫器材放同一處。

**2.3 化學廢物類別**

* 「鹵化溶劑」含鹵化物的有機溶劑(如三氯甲烷、三氯乙烯及二氯甲烷)，以

 及其化含鹵化物的液體有機化合物，應放入此容器。

* 「非鹵化溶劑」這類別為不含鹵化物的有機溶劑和其他有機化合物(如丙酮、 己烷及石油醚)。
* 「無機酸」此容器用於無機酸。有機酸應放入「用過的有機酸」容器。
* 「鹼」氫氧化鈉、氫氧化鉀及氨溶液，應放入此容器。
* 「潤滑油」泵油、潤滑油、液體煤油、礦物油等，應放入此容器。
* 「攝影定影液」此容器適用於膠片及照片沖曬用的定影劑。
* 「攝影顯影液」此容器適用於膠片及照片沖曬用的顯影劑。
* 「金屬溶液」含金屬離子或金屬沉澱物 (鉻(VI)及硼除外) 的水溶液應放入此容器。在酸或鹼溶液內的金屬離子或金屬沉澱物亦可放於此容器。
* 「有機酸」用過的有機應放入此容器。倘此類化學廢物產生率底 (如每月少

 放4公升)，而你的單位有「用過的非鹵化溶劑」或「用過的鹵化溶劑」的

 容器，可把有機酸放入此等容器。

* 「氫氟酸」倘沒有存放供這類化學廢物的容器，而氫氟酸的份量又少 (於無

 機酸廢物總容量中佔少於30%W/W) ，酸液可放於「用過的無機酸」的容器。

* 「氰化物」此容器內存放物的酸鹼值必須保持高度鹼性，以防釋出致命毒氣

 氰化氫。

* 「鉻(VI)或硼」溶液含任何份量鉻(VI)或硼的溶液，均應放入特別為其所設的容器。
* 「凝膠廢物」此容器用以盛載聚丙烯醯胺凝膠等。
* 混合廢物應按其中主要成分歸類，推下列者除外: 1. 含氰化物的廢物必須 放入氰化物容器。2. 倘所產的廢物為金屬溶液或沉澱物，可視乎其酸鹼值， 放入無機酸或鹼容器 (倘有此類容器)。倘酸鹼值為中性，應放入「用過的鹼」容器。3. 倘產生的用過定影液和顯影液總額少於每星期5公升，用過的定影液和顯影液可一同放入「用過的顯影劑」容器。4. 含鹵化化學品的混合物應放入「鹵化溶劑」容器 (即使鹵化部分只佔少數)。

**2.4安全預防措施**

* 處理化學廢物時，必須戴上防濺眼罩、手套和實驗室外衣。
* 應在通風櫃內傾倒會釋出煙和蒸氣的廢物。
* 新的化學廢物在倒進相應的容器前，必須先通過相容性測試。
* 相容性測試必須在通風櫃內進行。
* 為防止溢出煙和蒸氣，每次傾倒廢物之後應緊蓋容器。
* 高度活性的化合物、水活性化合物、高濃度氧化劑或還原劑，絕不可與其化化學廢物混合。此類化學品應分別盛於瓶子，歸於另一個廢物處置計劃處理。爆炸物品及水活性物品分別列於附錄C及D，以供參考。由於化學品種類繁多，這些列表不應視作詳盡無遺的清單。
* 倘於通風櫃之外處理化學廢物，處理者或須戴上配備適當濾罐的防毒面具。選擇及試戴防毒面具，可致電安全及環保處。

**2.5 處理用過的化學混合物**

* 含高度活性化合物、水活性化合物、高濃度氧化劑或還原劑的用過的化學品，絕不可與其他化學廢物混合。此類廢物應分別盛於密封的瓶子，而瓶子的製造材料須適合用於此類廢物。
* 傾倒廢物前，先為準備傾倒入的發物及容器內的廢物進行相容性測試。
* 必須在新化學廢物通過相容性測試後，方把化學廢物傾倒入適合的容器。
* 為防止滿溢，在加入新廢物之前，必須檢查廢物容器的液體水平。容器只應載至總容量的70%至80%，然後由安全及環保處收取。
* 為防止及控制濺溢，應使用漏斗和集水盤。
* 每次把廢物加入容器後，應立即將新廢物的資料寫入附於容器的化學廢物紀錄表。

**2.6 相容性測試程序**

* 此項測試應由一名富經驗人士於通風櫃內進行。
* 確保通風櫃的氣流速度屬於「安全」水平，而窗框調校至最少低於肩膊水平。
* 由需使用的廢物容器內吸取50毫升液體，注入一只燒杯。
* 把溫度計插進燒杯。
* 把少量準備傾入該容器的新化學廢物慢慢混入燒杯。兩種廢物的容積比例應與原來容器所盛份量與新廢物份量比例相若。
* 倘於混合時或於5分鐘內出現泡沬、冒煙或溫度顯著上升 (攝氏10度或以上)，應立即停止混和。此等跡象表示兩種廢物不相容。此時應把新廢物放入另一個容器，並填寫一份新的化學廢物紀錄表。
* 倘於5分鐘內無異樣反應，可把新廢物放入相應的容器。

**2.7 實驗場所排氣櫃 (Chemical Hood) 設置與使用原則:**

臺灣大學醫學院環安衛小組彙整98.04

一、安裝

 1.應有機電人員在場監督配電接地、管線之材質、配電盤錠設置等。

 2.排氣應透過排氣管道至頂樓並經空氣清淨裝置過濾後排放。

 3.排氣櫃裝設前，請務必事先知會營繕股現勘。

 4.安裝之相關原則請參考附圖。

二、自動檢查

 1.依照『勞工安全衛生組織管理及自動檢查辦法』規定 :局部排氣裝置於開始

 使用、拆卸、改裝或修理時，應依規定實施重點檢查，檢查項目如下 :

 a.導管或排氣機粉塵之聚積狀況。

 b.導管接合部分之狀況。

 c.吸氣及排氣之能力。

 d.其他保持性能之必要事項。

2.應每年定期實施自動檢查一次，定期檢查表可至環安衛小組網頁下載，檢查項目包括 :

 a.排氣櫃本體 (氣罩) : 外觀有無破損等等。

 b.導管 : 室內與室外部分有無破損情形。

 c.空氣清淨裝置 : 注意壓差並定期更換活性碳等。

 d.排氣機 : 機殼表面與傳動皮帶等等之狀態是否損傷或鬆動。

 e.風速 : 建議排氣櫃開口平均補集風速應達0.5 m/s以上。

 f.自動檢查表應懸掛於排氣櫃旁或明顯處。

 3.重點檢查或自動檢查紀錄均應規定保存三年以上。

三、操作使用

 1.應保持排氣櫃內部清潔。

 2.排氣櫃開口附近不宜堆置物品阻礙空氣流入，也不宜有明顯的干擾氣流(例如

 在室內吹電風扇)，以免影響排氣櫃開口流場。

 3.人員若須行經排氣櫃開口附近時，動作宜緩慢且最好遠離排氣櫃開口，以免

 人行進造成的氣流將排氣櫃內的空氣有害物捲出。

 4.嚴禁將排氣櫃當揮發性藥品櫃使用，化學藥品未皆類貯存恐有爆炸或火災意

 外發生之虞，具高度揮發性、易燃性或腐蝕性者，應購置專用(抽氣式)藥品櫃。

 5.從事具危險性或有害性之實驗應於排氣櫃內操作，且實驗場所『不得』無人

 在場。

 6.排氣櫃拉門高度應低於操作人員呼吸帶的高度。

 7.故障情形發生時，應將問題與故障排除方法填寫於自動檢查表中，以供實驗

 場所人員參考處理。

 8.抽氣櫃勿長期運轉不關機，此舉將造成室內冷氣經排氣櫃排出，使得各樓層

 冷氣嚴重不足。

**我已詳盡閱讀以上守則，並願意遵守規定**

使用者 : \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_

日期 : \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_

認證者: \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_

**第三章 Wet Bench 基本技巧**

**3.1 如何使用微量吸管 (micropipette)?**

[1] 依取用量多少，選擇最適合之Micropipette 種類 (2, 20, 100, 200, 1000 µL)。

[2] 一手按住黑色控制鈕，另一手轉動刻度旋轉鈕至所需之刻度，先停留於稍大

 之位置，再緩慢調至所需之正確刻度，鬆開控制鈕即能固定，不可強制調整

 刻度。

[3] 垂直握緊Micropipette，用力古緊一支盒子內餐Tip (材質為聚丙烯

 polypropylene, PP) 再稍旋轉取出，不要向下用力碰一聲地壓取 Tip。

[4] 輕輕按至第一段，插入所欲吸取之液面下約1 cm，保持垂直釋放品復至原位

 置，同時將 Tip之端沿液體邊壁劃過取出 Micropipette，因為 Tip外面會沾

 有一些多餘的液體，所以做此動作以將外頭的水分去除。

[5] 將 Micropipette移至釋液容器，輕輕按至第一段及按至第二段，再將Tip之

 尖端沿液體邊壁劃過取出 Micropipette，再按至第三段彈出Tip或用手取下。

[6] 為按制反應時間或做極微量的溶液混合者，用Micropipette吸取數種微量溶

 液進入Microfuge tube時，分別將液體釋放於不同位置之管壁(例如每120°)

 位置，再以離心瞬間混合。

[7] 不可將micropipette倒置或平放，避免讓液體倒流入 micropipette內，會造

 成吸管的不準確。

[8] 一天實驗結束時將 Micropipette 復原，調至最大刻度再收存，因為此時彈簧

 壓力最小，才不易彈性疲乏。

[9] 如果要測試自己 pipetting 的技術，可以用微量天平秤水的方式來檢測。

 a.將 micropipette調到最高值(即 1000, 200, 20 µL).

 b.微量天平上放秤藥盤並歸零，以 micropipette吸取 DI water, 加在藥盤

 上。重覆五次，記錄每次結果。

 c.如果有很大的 systematic error, pipette 可能要校正了。

[10] 定期要校正 micropipette.

**3.2 使用離心機 centrifuge**

 一定要在相對位置放等重的離心管。如果是高速離心機，用 swing bucket

的轉子，應該連同轉子和轉子的蓋子一起秤重。如果要轉很久，離心機開始轉時，

不要馬上離開，一定要等離心機轉到穩定的速度再離開。如果聽到離心機內出怪聲或晃動的很厲害，就馬上停止，再重新檢視是否有不平衡之處。絕對不能硬轉，否則轉軸會歪掉，換一個可以到百萬 (高速離心機) 了。

**3.3 混合 Mixing**

 配製溶液後，一定要充份混合。因為擴散是個很緩慢的過程，液體越濃稠，混合時間要越久, 為了加速混合，可以利用震盪混合器vortexer 幫忙。如果樣品裡含DNA 或其它怕shear 的樣品，可以用pipette up-and-down的方式來達到均勻混合。利用 pipette 混合時，很多時候要小心不要打入氣泡，所以不要將 pipette 壓到底。

**3.4 分裝 Aliquot**

 許多試劑很貴且在室溫空氣中會逐漸失效 (例如許多染劑)，這樣的藥品最好第一次使用時，先分裝。或者像泡好的培養液，一般建議也是分裝到 50 mL的falcon tube. 避免多次冷凍解凍(freeze-thaw), 也能避免不小心感染時，不會把整罐很貴的培養液都浪費了。

**3.5 清洗 Cleaning**

 如何清洗使用的容器要視實驗的要求。如果一般清洗，就像一般洗碗，刷子加洗潔劑，自來水沖一沖，在碗架上晾乾。如果想快速弄乾，可以用紙巾或 kimwipe 擦乾。

**3.6酸鹼測量 pH meter**

**我已詳盡閱讀以上守則，並學會如何獨立操作**

使用者 : \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_

日期 : \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_

認證者: \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_

**第四章 Cell culture 基本技巧**

**4.1 無菌操作基本技術**

1. 實驗進行前，無菌室及無菌操作台 (laminar flow) 以紫外燈照射30-60分鐘滅菌，以70% ethanol 擦拭無菌操作抬面，並開啟無菌操作台風扇運轉 10分鐘後，才開始實驗操作。
2. 每次操作只處理一株細胞株，且即使培養基相同亦不共用培養基，以避免失誤混淆或細胞間污染。
3. 無菌操作工作區域應保持清潔及寬敞，必要物品，例如試管架、吸管吸取器或吸管盒等可以暫時放置，其他實驗用品用完即應移出，以利於氣流之流通。實驗用品以70% ethanol擦拭後才帶入無菌操作台內。實驗操作應在抬面之中央無菌區域，勿在邊緣之非無菌區域操作。
4. 小心取用無菌之實驗物品，避免造成污染。勿碰觸吸管尖頭部或是容器瓶口，亦不要在打開之容器正上方操作實驗。
5. 實驗完畢後，將實驗物品帶出工作台，以70% ethanol擦拭無菌操作檯面。操作間隔應讓無菌操作台運轉5-10分鐘後，再進行下一個細胞株之操作。
6. 工作人員應注意自身之安全，須穿戴實驗衣及手套後才進行實驗。對於來自人類或是病毒感染之細胞株應特別小心操作，並選擇適當等級之無菌操作台(至少Class∥). 操作過程中，應避免引起aerosol 之產生，小心毒性藥品，例如DMSO 及 TPA等，並避免尖銳針頭之傷害等。
7. CO2培養箱 : 7.1. 細胞培養是否需二氧化碳供應，依細胞培養基種類而異。7.2 若細胞培養基以碳酸鹽為pH緩衝系統，則需補充二氧化碳以達到緩衝作用，應培養細胞於二氧化碳環境下，例如使用二氧化碳培養箱(常用之比例為5% CO2，95% air)，或是灌入適量二氧化碳至培養容器內，放入一般培養箱中培養即可。為使二氧化碳能夠流通，培養瓶(例如 T-flask)放入二氧化碳培養箱時應鬆開瓶蓋，或使用透氣瓶蓋。取出觀察時，則關緊瓶蓋，以避免污染。 7.3 若細胞培養基含有其化緩衝物質而不需二氧化碳供應，則放在一般培養箱中培養即可。 7.4. 培養箱內可放置水盤以維持適量之溼度，避免因培養基蒸發造成鹽類濃度之變化而影響細胞生長。

8. 定期檢測下列項目 : 8.1. 無菌操作台 : 注意airflow壓力，定期更換紫外線 燈管、HEPA過濾膜及 prefilter預濾網 ( 300小時/預濾網，3000小時/HEPA)。8.2 . CO2培養箱 : CO2濃度、溫度、及水盤是否有污染。 8.3. CO2鋼瓶 :CO2壓力 8.4. 恆溫水槽 : 定期換水。

**4.2 冷凍細胞活化**

1. 將新鮮培養基置於 37℃ 水槽中回溫(或其他適當之培養溫度)，回溫後以 70% ethanol 擦拭之，移入無菌操作台內。
2. 操作人員應戴防護面罩及手套，自液氮或乾冰容器中取出冷凍管，防止冷凍管可能爆裂之傷害。
3. 取出冷陳管，立即放入 37℃ 水槽(或其他適當之培養溫度)中快速解凍，輕搖冷凍管使其在 1~3 分鐘內全部融化，以 70% ethanol 擦拭保存管外部，移入無菌操作台內。
4. 依據細胞種類和濃度，於無菌操作台內取適量培養基加至適當之培養瓶中，緩慢加入已解凍之細胞懸浮液(一般稀釋比例為 1:10 ~ 1:15)， 與培養基混合均勻後，放入培養箱培養。可另取樣少許解凍細胞懸浮液作存活測試。
5. 解凍後是否立即去除冷凍保護劑 (例如DMSO 或 glycerol)，依細胞種類而異。對大多數細胞株而言，不需要立即去除冷凍保護劑。若要立即去除，則將解凍之細胞懸浮液加入含有 5~10 mL 培養基之離心管內，離心1,000 rpm、 5分鐘後，移去上清液，加入新鮮培養基，混合均勻，放入培養瓶內，置於適當之培養箱培養。
6. 若不需立即去除冷凍保存劑，則在解凍培養隔日後更換培養基即可。

**4.3 細胞計數與存活測試**

1. 取 100 µL 細胞懸浮液與 100 µL trypan blue 等體積混合均勻。
2. 取少許混液 (約 15 µL) 自血球計數盤 chamber 上方凹槽加入，蓋上蓋玻片，於100倍到立顯微鏡下觀察，活細胞不染色，死細胞則為藍色。
3. 計數四個人方格之細胞總數，再除4，乘以稀釋倍數(至少乘以2，因與trypan blue 等體積混合)，最後乘以104，即為每 mL中細胞懸浮液之細胞數。 4大格細胞總數 × 2 ×104/ 4= 細胞數/ mL
4. 若不用血球計數盤，可用自動粒子計數器 (Coulter counter, Coulter Electronics) 作自動計數，但無法辦別死細胞或活細胞。
5. 若細胞數目太多，可先用 phosphate buffer saline (PBS) 稀釋後再計數之。若細胞沉澱物太多而干擾染色與計數，可將其離心處理後 ( 1000 rpm, 5分鐘)，再計數之。

**4.4 細胞繼代培養**

附著型細胞 (adherent cell)

1. 吸掉舊培養液。
2. 用 Dulbecco's phosphate-buffered saline 洗滌細胞一至二次。
3. 加入 trypsin-EDTA 溶液 (1ml/T-25 flask, 2ml/T-75 flask) :
4. 方法一 : 37℃ 或室溫作用數分鐘，於倒立顯微鏡下觀察，當細胞將要分離而呈現圓粒狀時， 吸掉 trypsin-EDTA 溶液，輕敲培養瓶邊緣使細胞自瓶壁脫落， 然後加入適量之新鮮培養基，與脫落之細胞或細胞團塊混和均勻後，依稀釋比例轉移至新的培養瓶中，依正常條件繼續培養之。
5. 方法二 : 37℃ 或室溫作用數分鐘，待細胞自瓶壁脫落後，加入適量含血清之新鮮培養基，以終止 trypsin 作用 (因血清中含有 trypsin inhibitor，可以終止 trypsin 作用)，離心後去除上清液，或不作離心處理 ，添加新鮮培養基後依稀釋比例轉移至新的培養瓶中，依正常條件繼續培養之。

懸浮型細胞 (suspension cell)

1. 吸出細胞培養液，放入離心管中，離心 1000 rpm、5分鐘。
2. 吸除上清液，加入適量之新鮮培養基，與沉澱細胞 (cell pellet) 混合均勻後，依稀釋比例轉移至新的培養瓶中，依正常條件繼續培養。

融合瘤 (hybridoma)

1. 有些 hybridoma cell 而培養三天以上才會產生抗體，若是更換培養基，則可

 能會失去抗體。因此繼代培養不需離心後更換培養基，直接添加新鮮培養

 基稀釋細胞濃度即可。

**4.5 細胞冷凍保存**

1. 冷凍前應注意細胞生長情形，可在一日前更換半量或全量培養基。
2. 配製冷凍保存溶液 ( 使用前配製 ) :將DMSO加入新鮮培養基中，使其最終濃度為5~10%，混合均勻，置於室溫下待用。
3. 依細胞繼代培養之操作，收集細胞，並取少量細胞懸浮液計數細胞濃度及凍前存活率。
4. 將收集之細胞離心 1000 rpm、5分鐘後，去除上清液，加入適量冷凍保存溶液，混合均勻後，使細胞濃度為 1~5 × 106 cells/ ml，分裝至冷凍保存管中，每管分裝 1 ml。
5. 冷凍保存方法 1: 冷凍管置於 4℃、10~30分鐘 →移至-20℃、30分鐘\*\*\*→移至-80℃、16~18小時(或隔夜) →移至液氮槽 vapor phase 長期儲存。

 \*\*\*註 : -20℃不可超過1小時，以防止冰晶過大，造成細胞死亡。亦可跳過此步驟，冷凍管置於細胞冷凍盒內，直接放入-80℃冰箱，但存活率可能會降低。

1. 冷凍保存方法 2 : 冷凍管置於已設定程式之程式降溫機中，以每分鐘降 1~3℃ 速率降至 -80℃以下，然後放入液態氮槽之 vapor phase 長期儲存。

**4.6 培養基配製**

1. 細胞培養基通常須添加10%血清，為預留添加10%血清體積，此粉末培養基之配製體積為 900 mL。
2. 取粉末培養基溶於 700 mL milli-Q 水中，攪拌使其溶解。
3. 稱取 1.5 g/L之碳酸氫鈉粉末 (一般最終濃度為 1.5 g/L，但若有特殊濃度，則依該培養基之需求而加入適當之碳酸氫鈉) 溶於 200 mL milli-Q水中，攪拌使其溶解，然後通入 CO2 氣體至飽和，約10-30秒。
4. 將溶解且含飽和 CO2 之碳酸氫鈉溶液加入溶解之液體培養基中混合。混合後溶液之 pH應為 7.2-7.4，除非 pH值偏差太大，否則不需用酸鹼再調整之。若為太鹼，可再通入 CO2氣體調整 pH。過濾後，一般pH會上升0.1左右。
5. 以0.1或0.2 µm 無菌過濾膜過濾培養基，並分裝至已標示之無菌玻璃瓶中，貯存於 4℃ (血清亦可加入培養基中一起過濾)，
6. 培養基標籤應標示培養基種類、廠牌、貨號(catalog number)、批號 ( lot number)、配製日期與瓶號。
7. 取樣培養基測試其 pH 及滲透壓，並檢測生物污染。
8. 細胞培養基應置於 2~8℃ 避光保存。若出現沉澱或過期，則應捨棄不用。實驗進行前放在37℃水槽中溫熱後才使用之。

**我已詳盡閱讀以上守則，並學會如何獨立操作**

使用者 : \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_

日期 : \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_

認證者 : \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_