

实 验 室 规 范 手 册

暨南大学生科院生化系

目录

实验室安全管理办法	1
实验室安全事故处罚条例	4
实验操作指导规范	7
细胞房管理规定	12
生物安全 II 级操作规程	16
细胞房使用授权表	错误!未定义书签。
去除支原体污染管理暂行办法	21
细菌间管理制度	24
细菌间生物安全管理制度	26
实验室仪器操作要点	27

实验室安全管理办法

实验室集中了大量的仪器设备、化学药品、易燃易爆及有毒物质。有的实验需要在高温、高压或强磁、微波、辐射等特殊条件下进行，工作稍有不慎就有可能引起火灾、爆炸、触电、中毒、污染环境等，造成人身伤亡或财产损失等事故。因此，必须加强实验室的安全管理，采取切实可行的防护措施，减少或杜绝事故的发生。

一、 安全守则

1. 认真搞好实验室安全防护，做到安全实验、文明实验，切实保障国家财产和师生员工的人身安全。
2. 实验室对易燃、易爆、有毒、有腐蚀性等有害物品要分类放置，并指定专人保管，使用时必须执行严格的领用制度。
3. 实验过程中要严格按照实验规程进行操作，防止因为操作不当造成仪器损坏、药品泄漏及其它危害人身安全的事故发生。
4. 严禁任何人在实验室内烧水、做饭、就餐、就寝、洗衣服及存放任何私人物品。
5. 实验室工作人员对所属实验室要经常进行检查，发现问题及时向有关部门反映，特别是失火、失盗事故要及时报案，以便迅速处理。
6. 严禁与实验无关的人员随便出入实验室，不准随便将实验室钥匙、仪器设备等交予外来学生使用，防止失火、失盗等意外事故发生。人走后实验室务必关门关窗。

二、 用电设备使用安全

1. 使用电力时，应先检查电源开关、电机和设备各部分是否完好。如有故障，应先排除后，方可接通电源。

2. 启动或关闭电器设备时，必须将开关扣严或拉妥，防止似接非接状况。使用电子仪器设备时，应先了解其性能，按操作规程操作，若电器设备发生过热现象或有糊焦味时，应立即切断电源。

3. 人员较长时间离开房间或电源中断时，要切断电源开关，尤其是要注意切断加热电器设备的电源开关。

4. 注意保持电线和电器设备的干燥，防止线路和设备受潮漏电。
5. 实验室内不应有裸露的电线头；电源开关箱内，不准堆放物品，以免触电或燃烧。
6. 要警惕实验室内发生电火花或静电，尤其在使用可能构成爆炸混合物的可燃性气体时，更需注意。如遇电线走火，切勿用水或导电的酸碱泡沫灭火器灭火，应切断电源，用沙或二氧化碳灭火器灭火。
7. 没有掌握电器安全操作的人员不得擅自移动电器设施，随意拆修电器设备。
8. 做实验时先接好线路，再插上电源，实验结束时必须先切断电源，再拆线路。
9. 有人触电时，应立即切断电源或用绝缘物体将电线与人体分离后，再实施抢救。

三、有毒物品及化学药剂使用安全

1. 一切有毒物品及化学药剂，要严格按类存放保管、发放、使用，并妥善处理剩余物品和残毒物品。
2. 在实验中尽量采用无毒或低毒物质来代替毒物，或采用较好的实验方案、设施、工艺来减少避免在实验过程中扩散有毒物质。
3. 在使用大量易挥发毒物的实验室，应在通风设备中进行实验。
4. 注意保持个人卫生和遵守个人防护规程，绝对禁止在使用毒物或有可能被毒物污染的实验室内饮食、吸烟或在有可能被污染的容器内存放食物。在保证无毒的环境下工作时应穿戴好防护衣物；实验完毕及时洗手，条件允许应洗澡；生活衣物与工作衣物不应在一起存放。
5. 在实验室无通风橱或通风不良，实验过程又有大量有毒物逸出时，实验人员应按规定分类使用防毒口罩或防毒面具，不得掉以轻心。
6. 定期进行身体检查，认真执行劳动保护条例。

四、高压气瓶使用安全

1. 高压气瓶的搬运、存放和充装应注意事项：
 - (1) 搬动存放气瓶时，应须装上防震垫圈，旋紧安全帽，以保护开关阀，防止其意外转动和减少碰撞。

(2) 搬运充装有气体的气瓶时，最好用特制的担架或小推车，也可以用手平抬或垂直转动。但绝不允许用手握着开关阀移动。

(3) 充装有气体的气瓶装车运输时，应妥善加以固定，避免途中滚动碰撞；装卸车时应轻抬轻放，禁止采用抛丢、下滑或其它易引起碰击的方法。

(4) 充装有互相接触后可引起燃烧、爆炸气体的气瓶（如氢气瓶和氧气瓶），不能同车搬运或同存一处，也不能与其它易燃易爆物品混合存放。

(5) 气瓶瓶体有缺陷、安全附件不全或已损坏，不能保证安全使用的，切不可再送去充装气体，应送交有关单位检查合格后方可使用。

2. 一般高压气瓶使用原则

(1) 高压气瓶必须分类、分处保管，直立放置时要固定稳妥；气瓶要远离热源，避免曝晒和强烈振动。

(2) 新气体到实验室，收货人引导送货人将气瓶放入指定位置并回收无气体的瓶子，并且务必挂上有气体的标签。

实验室安全事故处罚条例

一、故意破坏

1. 故意对他人实验造成破坏的。例如故意污染他人细胞、故意将冰箱解冻、故意破坏他人电脑删除数据等。
2. 故意破坏实验室仪器设备，造成严重损坏或事故的。
3. 故意施放有毒有害物质，造成他人健康损害的。
4. 故意破坏实验室监控系统的。

处罚办法：此类事故需经安全委员会认定，责任人永久禁止进入实验室。触犯法律的，移送公安和司法机关依法处理。造成的经济损失完全由责任人赔偿。

二、重大责任事故

此类事故因过失不按操作规程操作而引发重大事故或者严重的潜在危险。

1. 生物安全类

- a) 未通过生物安全二级培训认证擅自在细胞培养间从事生物安全二级实验的。
- b) 将细胞培养间废弃物未良好进行灭活处理的。
- c) 不按生物安全二级操作规定随意乱扔针头、刀片等尖锐物的。
- d) 超过生物安全等级操作具有潜在危险的生物的，例如在生物安全一级区域操作强致病菌等。在封口容器内培养致病菌的除外。
- e) 基因改造生物(Genetically Modified Organisms)和强致病菌操作完毕未灭菌即丢弃的。

2. 有毒化学品类

- a) 挥发性有毒试剂（如苯、Trizol 等）未良好密封又长时间（大于半小时）不放于通风橱中的。
- b) 将含有核酸染料的胶、器具、溶液等放置在标明的污染区、专用垃圾桶以外的。
- c) 将含有挥发性有毒试剂（如 Trizol 等）的器皿、EP 管等长时间（大于半小时）置于通风橱外的，尤其是将装有挥发性有毒试剂的管子直接丢弃的。
- d) 将有毒试剂未经可验证的无害化处理倒入下水道的。

3. 样品保存类

- a) 将他人样品或试剂拿出冰箱并忘记放回，致使样品或试剂损失的。
- b) 将样品或试剂放置于与其明示的储存条件不符的环境中，致使样品或试剂损失的。例如将普通的酶放置于-80C 造成酶失活。
- c) 未严格按照细胞三级冻存制度取用细胞，造成冻存细胞损失的。
- d) 未经他人允许擅自动用他人的样品和试剂，造成样品或试剂的损失、污染的。

4. 设备安全类

- a) 在漏水的位置附近使用无防水保护的电器的。
- b) 违规使用酒精灯、电磁炉、微波炉等加热设备的，如人走不灭灯、酒精量少于 1/3 仍在继续使用等。
- c) 未严格按照操作规程操作，造成仪器损坏的。
- d) 强行使用已明示暂停使用或已明示处于非正常状态下的仪器的。
- e) 将仪器强行设置于安全值以外的设定值而造成仪器损坏的。

处罚办法：第一次通报批评并罚做值日；第二次禁止进入实验室一个月；第三次禁止进入实验室三个月；第四次以上永久禁止进入实验室。造成经济损失完全由责任人自己负责照价赔偿，若担心过失所造成的赔偿数额过于巨大而无法承受，请自行购买职业责任险。

三、非责任事故

严格按照操作规程操作，但仍然出现事故的，为非责任事故，当事人无需赔偿。但当事人需提交相关证据以自证属于非责任事故，否则视为责任事故。

四、不良习惯

1. 长时间开着窗子开空调。
2. 称量完药品之后不清理散落的药品。
3. 做完实验保证实验台面的整洁。
4. 放入灭菌锅时未拧松瓶盖。
5. 灭菌开锅后不拧紧别人的瓶盖。
6. 对有预约制度的仪器，不预约就使用的。
7. 不按实验室所设的汉字指示牌要求做的。

处罚办法：每年第一次通报批评，第二次通报批评+罚值日，第三次禁止实验一个星期，第四次或以上则禁止实验一个月。但属于法律上紧急避险的情形不算。

当事人若对指控不服，可向实验室安全委员会提出复议要求，由实验室安全委员会最终认定。

实验操作指导规范

一、实验习惯

- 1、 爱护仪器设备，节约实验材料，遵守操作规程，认真记录实验数据；
- 2、 仪器设备如有损坏，要及时报告登记，一旦发生事故，要及时采取措施，迅速如实地向实验室老师汇报，并保护现场，认真调查分析事故原因。
- 3、 节约使用水电以及各种实验用品。
- 4、 实验室要保持卫生、整洁，实验中丢弃的污废物或废液要按指定地点倾倒；严禁在室内吸烟、吃东西，严禁随地吐痰，严禁大声喧哗、打闹。
- 5、 实验室凳子使用完毕后将凳子放回实验台下。保证实验室走道畅通。所有可以搬动的物品，禁止用脚踢来踢去。
- 6、 放在走廊上的雨伞在晾干后主动收回自己的位置附近，避免影响实验室走廊畅通，保持实验室美观。
- 7、 设备器材摆放整齐，所有的仪器必须放回指定位置。
- 8、 必须轻手并确保关闭冰箱门、层析冷柜门、一维电泳房间的门，以及所有的实验柜子。
- 9、 使用完毕的烧杯、量筒必须清洗干净后放入器皿柜，禁止用完乱放。
- 10、 使用完的空药品罐必须盖好盖子然后放在垃圾桶边。有毒的试剂请务必做一个标签。
- 11、 开空调的时候禁止开窗。
- 12、 饮用桶装水必须把包装给撕掉才能装在饮水机上。
- 13、 进入细胞房必须更换拖鞋，佩戴口罩和帽子。在细胞房指示地标线外面更换鞋子，自己鞋子放在警示线外。细胞房拖鞋禁止穿出细胞房。外面的鞋子不能穿进细胞房。。
- 14、 穿着实验服不要坐办公用凳子，也不要进入休息室和会议室。
- 15、 禁止将枪头，SDS 胶等倒入水池，以免堵塞水池。
- 16、 保持实验室卫生整洁，禁止乱丢杂物，垃圾必须放入垃圾桶，不可丢掷杂物。实验台面上的物品井然有序。
- 17、 实验室晚上最后走的同学确保每个房间关闭，空调关闭（911 除外），电

脑关机，室内及走道灯关闭。

18、 工作时间（8:30am-5:30pm）不准玩游戏，看电影，不准下载电影等无关文件，实验室电脑不准私自设置密码。

19、 不得开着冰箱门找东西，在冰箱里找东西时务必保证冰箱门开启时间不得大于 1min。

20、 移液枪不得乱放，请各组人员保管好自己的移液枪。

21、 实验手套试行领用制度，做好登记制度。

22、 将带有转子的烧杯从搅拌器上取下时务必关闭搅拌器后待转子停止转动后方可取下烧杯。

23、 禁止徒手操作实验用品。

24、 第一次打开包装的试剂或者耗材必须注明开启时间，开启人姓名。

25、 烧杯和转子在使用完毕后必须洗净后放入器皿柜，晾干备用。

26、 纯水仪开启时，必须定好计时器，空桶接水不得大于 15min。

27、 该放回冰箱的东西是否放回了，冰箱门是否关严了。

28、 公用的东西是否还原了。仪器的电源是否关掉了。 试验台面是否清理了。做完实验后应当由实验人员保证实验台面的清洁。

29、 实验台废液缸只放废液，废枪头缸才只放除液体以外的物品。

30、 有预约表的仪器必须登记预约表，没有预约表的物品请使用标签纸标记清楚，并写好使用的日期和时间。

二、实验室安全

1、 具有挥发性的味道比较浓重的试剂或有毒试剂务必在通风橱内操作。

2、 玻璃碎片、针头（不是针管）等利器务必放入 911 的利器盒。

3、 水浴锅使用前应提前 1 小时开始，并贴纸条标识使用时间，务必检查水是否充足，水是否洁净，使用完毕后立即关闭。

4、 使用电磁炉加热样品时，必须保证电磁炉和锅底保持洁净，并且必须有人在实时观察，严禁出现干烧的情况。

5、 使用微波炉是，在开机状态下，使用人不得离开，并且实时观察。

6、 禁止在生物安全柜中使用明火，如酒精灯等。

- 7、 严禁湿手开启电闸和电器开关，手套湿的时候请擦干后再操作仪器，避免滴水到仪器表面。
- 8、 实验结束后必须到洗手间或 904 专用洗手池用洗手液洗手。
- 9、 实验室内严禁吸烟。
- 10、 禁止使用食品容器盛装实验室用品。

三、药品使用管理制度

- 1、所有药品、溶液必须有完整的标签，如果标签丢失，务必将标签补充完整，否则将以废液处理。
- 2、所有配置的试剂溶液，必须有完整的标签，注明：

溶液名称		配制时间	
配制人		配方	

- 3、药品应根据不同性质，性能和要求分类存放，称量完毕放回药品柜，做到存放整齐，取用方便，用后复原；部分药品要做好防潮，避光等工作。
- 4、浓酸、烧碱等具有强烈腐蚀性的试剂在操作时必须穿实验服、戴好口罩帽子做好个人防护工作，浓硝酸、盐酸、硫酸、正丁醇、氨水等具有挥发性气味的试剂，均应在通风橱内操作。如不小心溅到皮肤或眼内，应立即用水冲洗，然后用 5%碳酸氢钠溶液（酸腐蚀时采用）或 5%硼酸溶液（碱腐蚀时采用）冲洗，最后用水冲洗。
- 5、用完的药品、试剂空瓶确认瓶盖扭紧后方可丢弃，丢弃时应集中到实验室垃圾桶旁边，由值日生收拾到指定位置，最后统一处理。
- 6、有毒有害的药品、试剂、在丢弃时，必须使用安全可密封的瓶子装好后，密封，贴上标签，放到天台上统一处理。
- 7、遇到难以开启的试剂药品瓶时，开启时注意安全，严禁暴力开启试剂瓶。

四、仪器使用管理制度

- 1、严格遵守实验室的预约制度，所有的仪器务必进行预约后使用。
- 2、预约后如不使用，应立即取消预约，不准占用仪器，

3、不准出现预约不使用不取消或试验完成后才登记预约表的情况。

五、实验室卫生制度

1、用完的枪头、固体废弃物，放入指定废液缸；液体应当与固体分开废液缸，禁止向装有废液的废液缸丢弃枪头。

2、实验完毕后立即清理使用后的废液缸！

3、做有毒有害实验的，务必做好枪头、废弃物的消毒工作。

4、实验台面在使用前必须清理干净，然后开始实验，请务必保证实验台面的清洁。

5、实验台面使用完毕后立即清理。

6、实验完毕后，洗干净所用过的实验器材并整理好，摆放整齐。

六、其他

1、实验室试剂耗材经两个人以上测试有问题，务必立即通知相关老师，以便进行紧急事件的处理。

预约表

	星期一	星期二	星期三	星期四	星期五	星期六	星期日
7: 00-8: 00							
8: 00-9: 00							
9: 00-10: 00							
10: 00-11: 00							
11: 00-12: 00							
12: 00-13: 00							
13: 00-14: 00							
14: 00-15: 00							
15: 00-16: 00							
16: 00-17: 00							
17: 00-18: 00							
18: 00-19: 00							
19: 00-20: 00							
20: 00-21: 00							
21: 00-22: 00							
22: 00-23: 00							

细胞房管理规定

细胞房是进行各种细胞培养的净化级实验室，所有进入实验室的人员都必须遵守实验室有关的规章制度，接受实验室管理人员的管理。

第一条 细胞房主要由何庆瑜教授团队相关科研人员使用，其他人员如确实需使用细胞室必须预先征得实验室负责人和细胞房负责人同意。

第二条 使用人员需参加生物安全 II 级培训，专门的细胞培养室使用规范培训并通过考核后，方可获准进入细胞培养室进行实验。严禁未经许可擅自进入细胞培养室或使用相关设备。

第三条 在细胞培养室内不得进行微生物等其它易污染物的培养，禁止从事任何高危生化实验。如有不符合实验室工作和生物安全要求的，实验室负责人和细胞室工作人员有权责令停止实验，并执行灭活消毒程序。

第四条 实验人员应爱护实验室各类仪器，按照规则使用并保持设备清洁。实验中的昂贵设备，未经许可不得擅自开关。精密仪器需经专门培训后方能操作未经许可不得改变设备仪器的预设参数。设备仪器出现故障或发生事故，应及时向仪器负责人报告，安排专业人员进行检修。

实验操作

1. 穿着专用实验服。
 - 1) 实验人员必须在细胞房缓冲间内更换细胞室专用实验服；
 - 2) 严禁不穿实验服或直接穿着普通实验室实验服进入细胞室；
 - 3) 严禁穿着普通实验服再穿细胞房实验服；
 - 4) 穿细胞房实验服时请摘下手套，避免手套对衣服的污染；
 - 5) 自己的白大衣或厚外套，可脱在第一道门的衣帽架上。
2. 穿着专用拖鞋。细胞房缓冲间警示线外面换下自己的鞋子，尽量避免在缓冲间走动、停留。
3. 将物品带入细胞房时，必须在缓冲间用 75%酒精喷洒物品表面。
4. 长发的女生务必把头发绑起，或者戴好帽子进行实验。
5. 实验过程中严禁喧哗，闲聊。

培养箱使用规则

1. 从培养箱取放物品前，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，务必轻手轻脚打开或关闭门，避免产生培养箱的震动，造成部分细胞生长状态不好。

注：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。

2. 从培养箱拿取细胞时轻拿轻放，动作迅速，随手关紧培养箱门。未经允许，禁止翻看、移动他人细胞或样品，如有特殊需要的，请联系实验室负责人协调。

3. 培养瓶皿放入培养箱前，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. 培养箱内细胞培养的放置需整洁有序，方便查找，同时应尽量提高培养箱的使用效率。

5. 普通培养中的细胞，若非实验特殊需要，每瓶/板细胞每天只需要观察生长状态一次，2人以上共用的细胞，可约好时间一起观察。

注：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. 值日人员应经常注意检查培养箱温度、CO₂气体量是否相符设定值。密切注意培养箱内的增湿盘，定期更换无菌水并进行消毒。密切注意培养箱内情况，如出现霉变、菌斑、支原体和衣原体感染或其他明显染菌迹象，应立即通知管理员及其它使用者。

显微镜使用规则

1. 保证倒置显微镜的整洁。

2. 离开细胞室时或较长时间不需使用时，及时调暗显微镜灯泡或者关上电源，延长灯泡寿命。尽量避免频繁开关显微镜电源。

超净台相关操作规则

1. 超净台使用遵循预约原则。

a: 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。

b: 使用记号笔在预约表格上提前预约下一周的使用时间，请注意周六周日是指上周的周末。

2. 超净台使用前用紫外灯照射 30 分钟灭菌，使用前、后需用酒精棉球擦拭工作区消毒，所有物品放入超净台内使用前均应消毒，超净台内严禁堆放过多物品影响风路平衡，不同超净台内物品严禁交换使用。

3. 细胞房严禁使用酒精灯。

4. 超净台中废液杯，应在实验前加入漂白水，实验结束后，待废液缸内的培养基颜色褪去后，废液倒入 911 通风厨的水池，固体垃圾倒入细胞房灭菌间桶内灭菌。值日生负责把灭菌后的固体垃圾放入 911 大白桶内，待清洁工清理。

注：废液缸应及时处理，严禁长时间放置，以免留有大量培养液滋生细菌。

5. 细胞实验后任何含有细胞培养污物的培养瓶，离心管，移液管等必须及时灭菌后带出细胞房。
6. 其他垃圾自行带出细胞房。

冰箱、试剂等相关操作规则

1. 从冰箱取放物品动作要迅速，关门时要检查门是否关好。按类别存放试剂。严禁长时间敞开冰箱门。
2. 各人存放于冰箱内的培养液、生化试剂、样品要注明姓名、配制日期、样品名称，特殊试剂需获得细胞室管理人员同意后方可放置。不得使用他人的培养液或其他生化试剂。
3. 分装好的血清长时间保存于-80℃，使用前放于 4℃预解冻。原则上解冻好的血清应全部配成含血清的培养基备用，若有剩余，则暂存于 4℃并尽快使用。尽量不要使用他人开过的血清，以免交叉污染。
4. 细胞室内的冰箱空间有限，尽量仅放置使用频率较高的试剂。请勿将一些闲置试剂，污染试剂长期放置在细胞室。
5. 工作人员会定期对冰箱进行清理，发现无标记，过期试剂等违规物品将全部清除出去，并且查找试剂配置人给予警告。

进入细胞室物品控制

1. 所有进入细胞室的物品必须经过酒精表面消毒。
2. 严禁将可能含有污染物或病原菌的实验物品带入细胞室。
3. 细胞室不存放个人耗材，所有个人耗材做完实验全部带出细胞房。
4. 细胞室内储物柜的物品放置由相关管理人员安排，并做标记。

细胞室清洁守则

日常维护：注意培养箱显示正常，显微镜，冰箱，超净台的正常使用与维护。细胞室内以及门口生物样品专用垃圾桶的及时清理。

- 1、细胞房值日人员务必在上午九点以前参照值日表内容进行值日。
- 2、清扫地面垃圾。
- 3、准备 75%酒精（保证每天容量为四分之三容器体积）。
- 4、准备 95%酒精（保证每天容量为四分之三容器体积）。
- 5、准备漂白水。
- 6、准备棉球。
- 7、整理显微镜桌面并倾倒废液缸，废液缸禁止存留废液过夜。

- 8、检查各个仪器是否有报警声音。
- 9、检查培养箱是否正常运行（气体，超纯水）。
- 10、每周一次用洗衣机洗绿色实验服。
- 11、每周清洗一次细胞计数板：75%功率超声 15min。
- 12、每周第一天，擦掉预约表上信息，并标记好本周日期。
- 13、每天进查看细胞房面板信息及紫外自动运行状况。

需要进入细胞房进行操作的，请参照以下步骤申请：

- 1、 提前一周仔细阅读细胞房操作规定，学习生物安全二级培训。
- 2、 打印生物安全 II 级操作规程，在最后一页上在申请人签字。
- 3、 经指导老师签字批准后提交给细胞房管理员，
- 4、 由细胞房管理员安排培训时间和培训负责人，（培训负责人进行第一次培训时，细胞房管理员必须参加。）
- 5、 培训数次后，经培训人认定合格。
- 6、 培训负责人向细胞房管理员提交新生的考试申请，并预约考试时间，申请考核。
- 7、 经考核通过后方可领用实验物品，开始自己的实验。

生物安全 II 级操作规程

A. 功能蛋白质研究中心细胞培养房的使用前提是何庆瑜教授团队管理员批准，任何本中心和外单位人员不可擅自使用。

B. 适用范围

本操作规程是按照生物安全 II 级 (Biological Safety Level II, BSL-II) 的操作要求编写，适用于所有可能具潜在非空气传播的 (non-airborne) 感染性病原体的样品操作。这些样品包括：人血/组织样品、动物血/组织样品、腺病毒、腺相关病毒、慢病毒、携带病毒的细胞株以及所有 MSDS 或产品说明书标示为 BSL-2 的样品操作。同时，为了避免组织培养的生物污染，细胞间内和常规实验室的生物安全 I 级的细胞和组织培养也应当遵守本操作规程。

C. 细胞间的准入条件

1. 熟知 A-G 部分所列出的操作规程，经过中心培训，本人签名愿意遵守本规程。
2. 在满足 C1 的前提下，非功能蛋白质研究中心人员另需提供拟使用细胞间的实验目的和操作步骤的书面材料，并得到各自所属实验室 PI 的签名知情认可。若使用细胞间期间实验内容有所变动，应及时知会本中心细胞培养房管理员。

D. 基本 BSL-II 操作规程

1. 实验人员进入细胞房时，应先更换细胞房内专用的拖鞋及实验服、帽子，再戴实验手套。留长头发的必须把头发扎起来，方可进入细胞房。所有细胞和组织培养样品需戴手套进行，并严格使用无菌实验操作技术 (具体操作由各自实验室培训)。

2. 灭活规程

漂白水 (6-8%次氯酸盐溶液)，稀释 10 倍后用于灭活 BSL-II 病原体。在无菌操作台的废液缸内加入 1/3 体积的漂白水，使用过的枪头、EP 管和等都需要放到废液缸中用漂白水浸泡，滤干液体后丢弃入废物桶。无菌操作台另放置一瓶漂白水，用于辅助灭活操作 (例如溅出物处理，临时需要增加废液缸中漂白水，或者灭活离心管内部等)。离心管和移液管应该用漂白水处理内部，之后可统一回收使用。注意漂白水会腐蚀不锈钢。

70%乙醇 用于擦拭工作台，手套，仪器表面等。

3. 控制飞沫污染

3.1 一些容易产生飞沫污染的动作，如大力混合、高速涡旋等应使用封闭的容器，结束操作后应静止一段时间，最好直至容器内气泡和飞沫消失后才打开盖子进行进一步操作。

3.2 吹打和混匀过程中要避免产生飞沫。吹打细胞悬液过程中，要将枪头随液面上下移动，不要将枪头中的最后一滴培养基吹打入细胞悬液，以免培养基中产生气泡。

3.3 打开离心管、培养瓶的动作要缓慢。

锋利物品的处理：注射针头、刀片等尖状物使用完用漂白水浸泡后丢弃到专门的容器内（Sharp Container）。

4. 一周要对细胞房的实验服进行清洗、灭菌一次。

E. 无菌台内的操作

1、 调整操作者座位的高度，以免操作者的脸部正对着操作台面。

2、 开始细胞操作前和完成实验后都要用 70%的酒精擦拭台面。

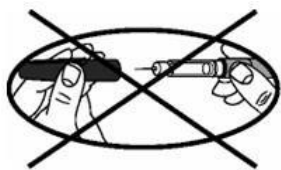
3、 除移液枪、废液缸、漂白水、和试管架，无菌操作台不应滞留任何个人的实验物品。每位操作人员完成实验后务必将个人的东西拿出无菌操作台。

4、 废液应倾倒至废液缸的漂白水中，操作动作要轻缓、连贯，尽量避免产生飞沫。

5、 如果废液滴在工作台面，需先用拧干的酒精棉在原处吸干溅出物，之后用 70%酒精擦拭灭活。该操作可以避免污染物进一步扩散。

6、 针头操作。

i) 错误做法。用双手盖回针头保护鞘极易被刺伤，**必须坚决杜绝！**



ii) 正确做法。将针头鞘放在桌上，然后盖回针头，最后将废弃针头（一定要盖上保护鞘）扔入专门的 Sharp Container。



iii) 一旦被针头刺伤，应该立即尽量将血挤出，之后用双氧水仔细清洁伤口。若已知操作潜在感染性样品（例如人血和组织样品）被刺伤，在进行上述紧急处理后，应立即到医院遵医嘱进行紧急处置。注意：即使是健康供者来源血液和组织样品也被认为是潜在感染性样品。

F. 显微镜使用

1. 培养瓶在显微镜观察前，必须旋紧瓶盖。
2. 当要用到血球计数板做可能具感染性的细胞计数时，计数板应该放到干净或消毒的培养皿里，再转移到显微镜观察。用完后，先用漂白水消毒计数板，用清水冲洗，并用 70%酒精冲洗计数板上的污垢。操作显微镜前换手套或用酒精喷洗。
3. 使用完显微镜后用 70%酒精清洁显微镜。
4. 倒置显微镜在不用时将显微镜的旋钮调至最暗，然后关闭显微镜的灯泡。显微镜的灯泡不需要预热，所以用之前再打开，用完之后可立即关闭。

G. 紫外灯的使用：

细胞培养间和无菌操作台的紫外灯应尽量在使用前后 30min 左右开启照射。应避免长时间照射。

H. 关于培养箱：

1. 培养箱务必轻开轻关，减少培养箱的震动。
2. 在取细胞前必须对手套喷上消毒剂消毒。
3. 拿细胞时动作要迅速，并随手将培养箱门轻轻关上。禁止开着培养箱门说话，长时间打开培养箱门。
4. 记住放置细胞的位置，未经他人允许，不得动用别人的细胞。
5. 每个人都有义务和责任经常观察 CO₂ 钢瓶中气体的使用状况。

- I 离开细胞房前的友情提示
1. 清洁和消毒所有操作过的地方
2. 所有用完的耗材拿出超净台，放回应该储存的位置
3. 正确处理废物
4. 调节水浴锅和培养箱水位
5. 关掉显微镜、离心机
6. 随手关门。

生命与健康工程研究院功能蛋白质研究中心

细胞房使用授权表

申请人：	性别：	职务：教师/学生	职称/年级：
导师：	联系电话：	Email：	
实验内容	<input type="checkbox"/> 原代培养 <input type="checkbox"/> 传代培养 <input type="checkbox"/> 正常体细胞培养 <input type="checkbox"/> 肿瘤细胞培养 <input type="checkbox"/> 干细胞培养 <input type="checkbox"/> 克隆培养 <input type="checkbox"/> 细胞毒性实验 <input type="checkbox"/> 细胞融合 <input type="checkbox"/> 细胞转染 <input type="checkbox"/> 其他_____		
使用时间	年 月 日 — 年 月 日	出入频率	<input type="checkbox"/> 每天一次 <input type="checkbox"/> 每天两次 <input type="checkbox"/> 一周两次 <input type="checkbox"/> 一周三次
培训安排		申请培训时间	年 月 日 — 年 月 日
申请人签字	本人承诺：将严格遵守细胞培养室管理规章制度，服从管理；如有违反，愿接受相关处罚。 签名：_____ 年 月 日		
导师意见及培训后确认	（请对学生能否申请培训予以确认） 签字：_____ 年 月 日	（请承诺对学生使用细胞房过程中的规范操作予以督促） 签字：_____ 年 月 日	
培训老师意见	（请对学生能否达到规范使用细胞室予以评价） 签字：_____ 年 月 日		
细胞室负责人意见	（如同意使用，请填写对使用者的要求与责任；如不同意使用，请写明具体理由。） 签字：_____ 年 月 日		
备注			

去除支原体污染管理暂行办法

为了保证细胞房的优良环境，最终达到去除支原体污染的细胞的目的，制定如下管理办法：

一、新到细胞的支原体检测申请。

1、所有来源的细胞，在未经检测时，可在指定区域进行短暂的细胞培养，并尽快进行支原体检测。

2、支原体为阳性的样品，必须转移至有支的培养箱内培养，需要去除支原体的，经检测合格后，方可使用无支的细胞培养方式。

二、常规支原体检测：

实施每月检测制度。

支原体检测以依科赛 PCR 试剂盒为准。

每月 10 日前所有在培养过成长的细胞必须准备好待测样品。样品制备要求：培养两天的细胞培养上清，或者消化下来的细胞。

每组一个负责人，收集组内样品，并进行 PCR 检测。

支原体检测要求：

检测结果须有正常工作的阴性和阳性对照结果；

跑胶样品使用的 marker，包含 100 到 250 的条带，易于识别。

清理细胞培养箱流程

- 1、将培养箱内的细胞瓶、培养板取出，如有需要，请转移至其他培养箱中，如果处理时间不到 1 个小时，可以先将细胞转移至超净台中。
- 2、关闭培养箱的电源，电源按钮在培养箱门的左下角处（Thermo）。
- 3、拆卸培养箱内所有的支架，包括三张不锈钢板，六个不锈钢短支架（横放，棍状），四个不锈钢长支架（竖放，有卡口），另外，如需大规模清理，还可以将门上的胶垫拆下
- 4、对已经拆卸的各个部分进行清洗，可先使用去污剂等清洗后，在用配制好的新洁尔灭进行擦拭，晾干
- 5、去除培养箱中残余的水（可用虹吸，或直接舀出），用配制好的新洁尔灭对培养箱内胆进行全面的擦拭，至少擦拭两遍（使用医用纱布擦拭）。
- 6、待全擦拭完毕后，将所有拆卸出的配件装回培养箱，在培养箱底部加入 350ml 纯水（如使用无菌水更佳），启动培养箱电源，按照面板上的提示开启培养箱的自动灭菌程序。
- 7、该程序大约运行 25 小时，待其结束后，继续根据面板上的提示进行操作，完成下一步的程序。
- 8、待全部灭菌程序完成后，向培养箱中加入足够量的无菌水，待其温度恢复到 37 摄氏度，CO₂ 浓度恢复为 5%以后，即可使用。

如不使用灭菌程序，仅对培养箱进行简单的擦拭，则直接进行 1、3、4、5 并将擦拭干净的配件装回培养箱即可。

细菌房管理制度

1. 使用细菌房超净工作台和生物安全柜的学生，首先要接受相关培训，得到准入以后，才能进入细菌房进行实验操作。
2. 使用生物安全柜的同学，在操作时，必须穿实验服，戴帽子、口罩、手套，尽量减少裸露在外面的身体部分。
3. 使用生物安全柜和超净工作台的同学，请事先填写预约表，以免发生实验冲突事情。
4. 细菌房的二氧化碳培养箱只能用于细菌组感染性细菌的培养；其他做转化、克隆等实验的培养皿请放于高压灭菌房的 37℃烘箱里，严禁相互之间串用。
5. 使用生物安全柜和超净工作台的同学，使用之前请用 75%的酒精彻底消毒台面，移液器及准备拿进操作台的相关实验器材，然后进行紫外照射 15 分钟以上，以确保无菌操作，使用之后，从操作台中拿出自己的相关实验器材，再用 75%的酒精彻底消毒台面及彻底清理废液后，废液缸中补充新洁尔灭溶液。
6. 生物安全柜和超净工作台里只能放置公用器材，如移液器、酒精灯、废液缸等，严禁个人用品放在里面，尽量减少污染。
7. 生物安全柜里只容许使用远红外灭菌器，不容许使用明火装置，如酒精灯，以免发生安全隐患。
8. 生物安全柜和超净工作台里面的物品不容许相互串用，以免发生污染。
9. 使用生物安全柜者，仅限于操作感染性菌株的同学，超净工作台用于常规的接种、转化、挑克隆等。
10. 细菌房的二氧化碳培养箱每个月进行一次彻底清洁、消毒，以减少污染（由值日生轮流进行清洁、消毒）。
11. 细菌间的值日生值日要求：
对相关菌株用过的器皿（15ml 离心管，50ml 离心管、枪头等进行高压灭菌），用新洁尔灭溶液浸泡小桶过夜，然后进行清洗，负责生物安全柜和超净工作台台面的卫生（台面的清洁、消毒，废液缸的清洁、消毒等，配置公共的新洁尔灭溶液、75%酒精溶液等，定期清洗工作服及清洗、消毒二氧化碳培养箱，负责清洗紫外分光光度计的比色皿。

12. 细菌组的同学要求常规耗材每两人为一组，放置在细菌房的小柜里。其他课题组同学自备。
13. 非细菌组同学需要进入细菌房做相关实验室，需经细菌组同学指导并考核通过，方可进行自己实验。遵守细菌房卫生规定，不得将慢病毒等实验废弃物（养菌用 EP 管，三角瓶等）堆弃细菌房，需自行灭菌清洗。

细菌间生物安全管理制度

1. 微生物学的实验对象，大多是病原微生物。因此，需严格贯彻《国家病原微生物实验室生物安全管理条例》，加强实验材料的管理，以防止实验中的自身感染和环境污染。
2. 传染病菌种的保藏、运输、领用、管理等，均按照国务院卫生行政部门的相关规定执行。
3. 微生物实验从事病原微生物相关实验活动时，应至少在生物安全柜中进行，防止致病微生物扩散，保证生物安全和操作者的人身安全。
4. 对微生物实验中的污染菌液，应立即倒 2%-3%来苏尔或 5%石炭酸，浸泡半小时，高压灭菌后除去。
5. 使用过的吸管、试管、离心管、培养皿、手套等应放置在指定地点，实验结束后置于密封盒内，经高压蒸汽灭菌后，再进行相关处理。
7. 细菌污染的玻璃器皿被打破后，应放置于洁净容器内，经高压消毒后再丢弃。
8. 实验过程中，应采取生物安全防护措施、如生物安全柜或其它防护措施，做好通风，以防产生的气溶胶污染。
9. 严格遵守无菌操作，如发生微生物污染了皮肤、衣物或吸入菌液应立即报告教师和实验室主管，及时进行清洗消毒等相关处理。
10. 菌种存放在实验室指定位置，建立完整档案，实行专人管理制度。
11. 未经批准，任何学生和教师禁止把病原微生物带出实验室。

实验室仪器操作要点

1. **倒置显微镜的使用：**开关显微镜时务必将显微镜的灯光旋钮调至最暗。

显微镜的灯泡不需要预热，所以用之前再打开，用完之后可立即关闭。

2. **微量移液器的使用：**微量移液器在使用完成后必须调回最大量程。

微量移液器在使用时必须轻缓的吸取，避免因急速吸取导致液体进入枪中。

微量移液器在吸入液体后禁止水平放置。

实验室有酸碱专用的移液器，置于 911 通风橱内，避免使用自己的枪吸取强酸强碱。

移液器在吸入液体后保持与水平不小于 45° ，禁止横握或水平放在桌子上。

3. **离心机的使用：**

离心机如果需要低温离心，需提前开启离心机预冷。

离心机在使用时必须配平使用。

离心机在使用完毕后，关机并将离心机盖打开，防止空气中水汽凝结腐蚀离心机，最后关闭离心机。

4. **甲醇乙醇等试剂的空瓶：**用完后放在 9 楼天台，之后统一收到实验室的废瓶回收处。

水电维修科：85220117

网络中心：85220304