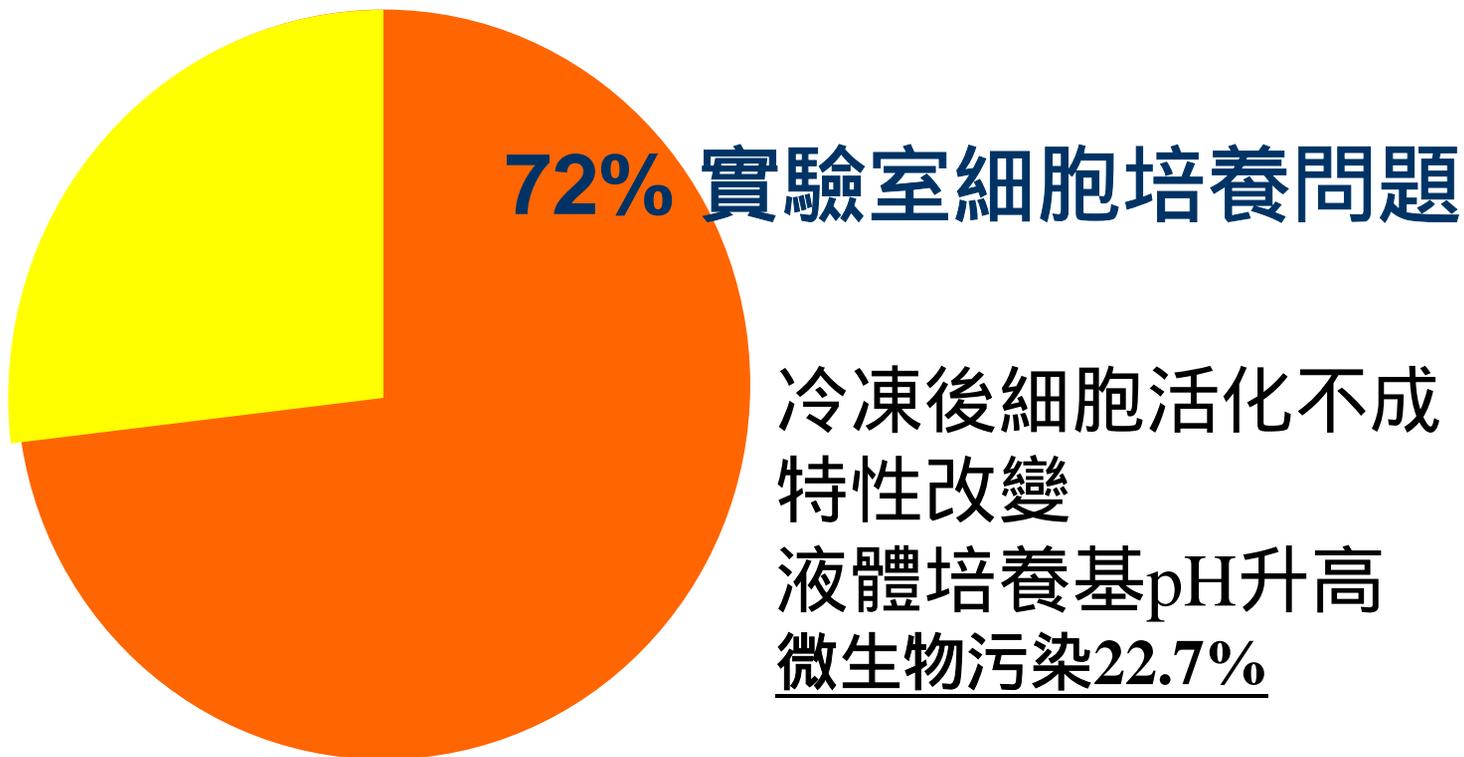


實驗室細胞之有效管理

黃效民

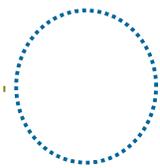
92.09.08

2000 Survey



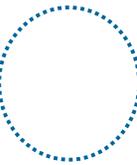
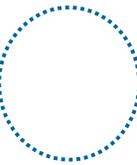
72% 實驗室細胞培養問題

冷凍後細胞活化不成
特性改變
液體培養基pH升高
微生物污染22.7%



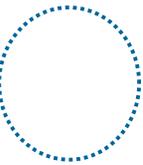
實驗室細胞的有效管理

- ▶ 設施(facility)
- ▶ 人員(personnel)
- ▶ 訓練(training)
- ▶ 嚴格和有效的管理系統(strict & effective regulatory system)
- ▶ cGMP, cGTP, ISO, CNLA.....



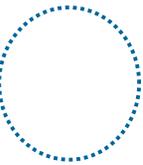
細胞之管理

- ▶ **觀念正確最重要**
 - ▶ 無菌觀念
 - ▶ 品管觀念
 - ▶ Banking
- ▶ **嚴格的執行**
 - ▶ 每日清潔
 - ▶ 每週清潔
- ▶ **緊急處理**
 - ▶ 細胞污染之處置
 - ▶ 儀器功能異常之處置



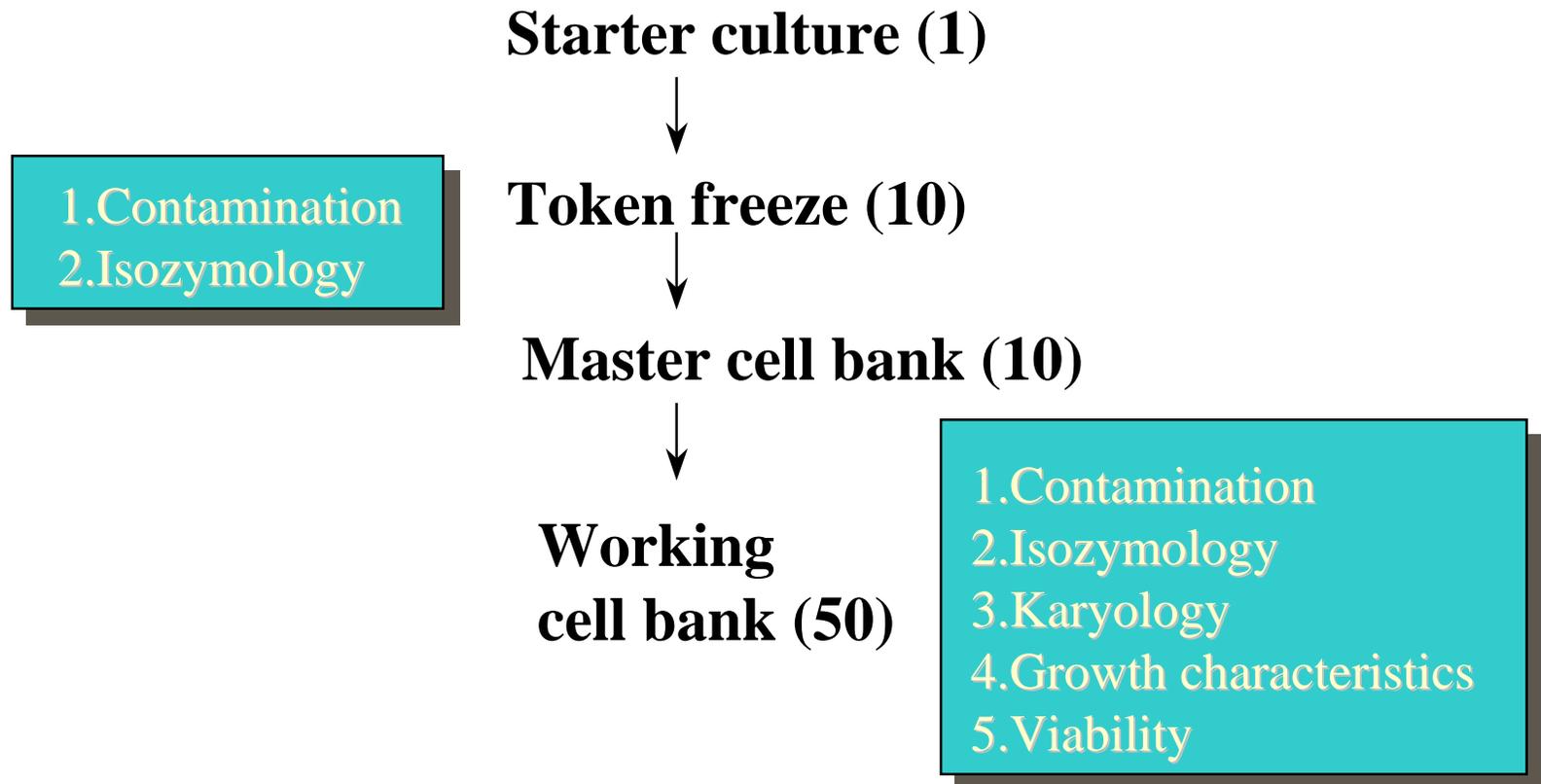
細胞庫系統 (Banking System)

- ▶ 實驗/研究期間足夠量的細胞
- ▶ 降低污染機會
- ▶ 細胞之貯存
 - ▶ token, MCB, WCB in liq./vapor phase of liq. Nitrogen
 - ▶ Documentation: location, identity and inventory of individual ampoule of cells
 - ▶ at least 2 separate storage areas



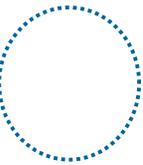
細胞株之增殖

國內外個人捐贈者



對一般研究人員之建議

- ▶ MCB(5), WCB (10) for ten years' resaerch
- ▶ 冷凍管細胞之品質
 - ▶ 細胞冷凍過程之傷害，必需最小
 - ▶ 細胞冷凍管之保存
 - ▶ 避免浸入液態氮中(除非使用玻璃冷凍管且燒封，或另使用cryoflex保護)
 - ▶ 冷凍管之材質和品質效期
 - ▶ 放置記錄檔案必須有效和隨時更新
 - ▶ 液氮之充填



程式降溫機：細胞之冷凍溫控



冷凍細胞之 儲存管理

1. 菌株細胞(MVC) 2. L92 3. 種子庫 儲存位置圖

Table L17 Box BA42 Pool 99

	1	2	3	4	5	6	7	8
1	CM02111	CM02114	CM02117	CM02120	CM02123	CM02126	CM02129	CM02132
2	CM02135	CM02138	CM02141	CM02144	CM02147	CM02150	CM02153	CM02156
3	CM02159	CM02162	CM02165	CM02168	CM02171	CM02174	CM02177	CM02180
4	CM02183	CM02186	CM02189	CM02192	CM02195	CM02198	CM02201	CM02204
5	CM02207	CM02210	CM02213	CM02216	CM02219	CM02222	CM02225	CM02228
6	CM02231	CM02234	CM02237	CM02240	CM02243	CM02246	CM02249	CM02252
7	CM02255	CM02258	CM02261	CM02264	CM02267	CM02270	CM02273	CM02276
8	CM02279	CM02282	CM02285	CM02288	CM02291	CM02294	CM02297	CM02300
9	CM02303	CM02306	CM02309	CM02312	CM02315	CM02318	CM02321	CM02324

Office

Microsoft

工具(T) 視窗(W) 說明(H) 輸入需要解答的問題

細胞庫研究中心
Technologies Center

庫房管理系統

基本資料

員工管理(E)

菌株基本資料(I)

入出庫型態(P)

入出庫原因(R)

入庫作業登錄(L)

出庫作業登錄(O)

統計

菌株位置圖查詢

月-菌株入出庫

菌株數量

補庫菌株

系統功能

返回系統資料庫

結束庫房管理

NUM SCRL

產品開發管理系統

Product Development Management System

產品開發管理系統

產品開發管理系統

日期	事項	備註
2008/10/10	產品開發管理系統	
2008/10/11	產品開發管理系統	
2008/10/12	產品開發管理系統	
2008/10/13	產品開發管理系統	
2008/10/14	產品開發管理系統	
2008/10/15	產品開發管理系統	
2008/10/16	產品開發管理系統	
2008/10/17	產品開發管理系統	
2008/10/18	產品開發管理系統	
2008/10/19	產品開發管理系統	
2008/10/20	產品開發管理系統	
2008/10/21	產品開發管理系統	
2008/10/22	產品開發管理系統	
2008/10/23	產品開發管理系統	
2008/10/24	產品開發管理系統	
2008/10/25	產品開發管理系統	
2008/10/26	產品開發管理系統	
2008/10/27	產品開發管理系統	
2008/10/28	產品開發管理系統	
2008/10/29	產品開發管理系統	
2008/10/30	產品開發管理系統	
2008/10/31	產品開發管理系統	

Technologies

庫別(S)



低溫庫房之線上監控

溫度監控
檔案(Y) 說明(O)
文字模式 低溫冷凍及基因保存庫 液氮菌種保存庫 專利菌種保存庫

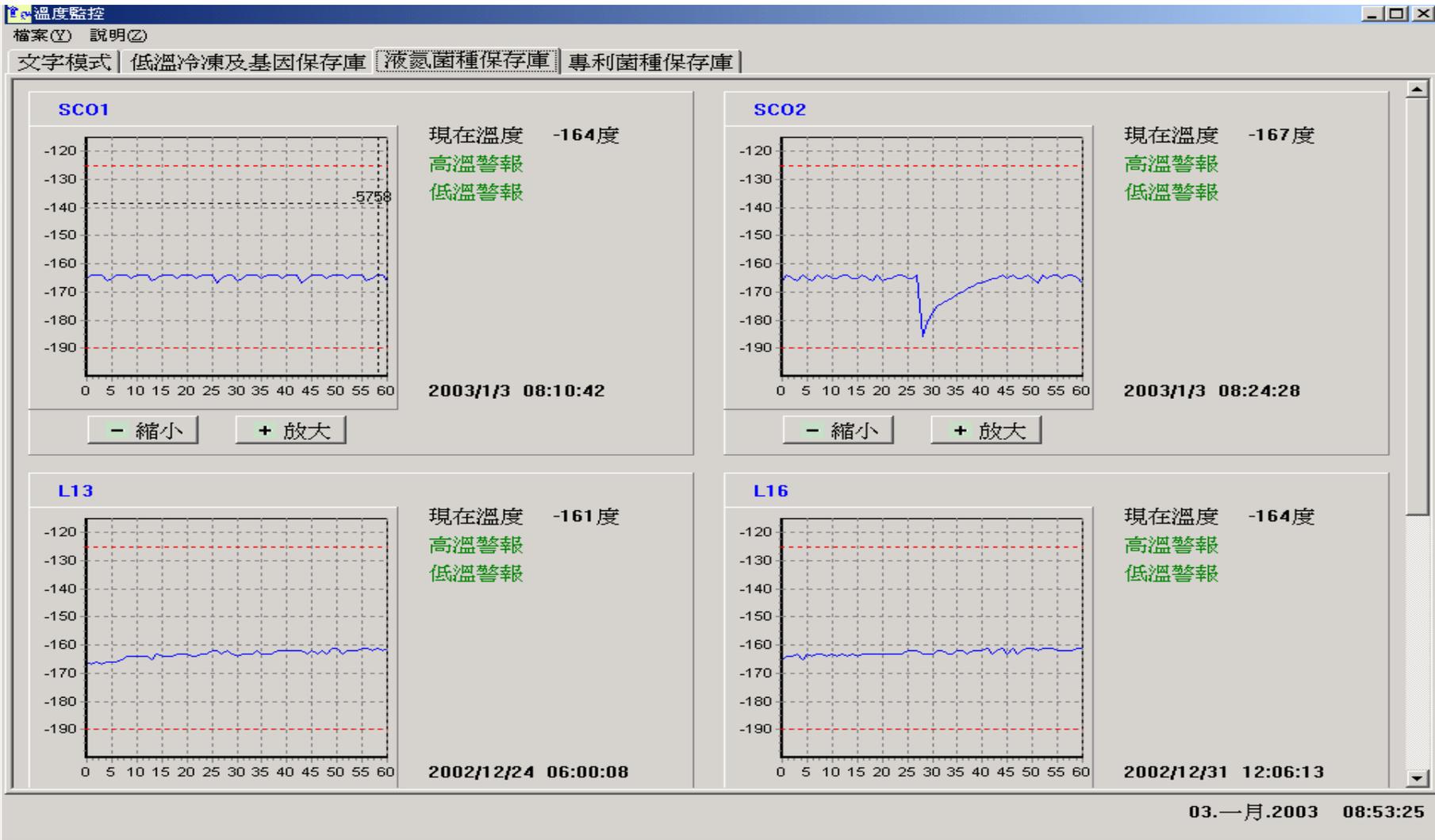
液氮菌種保存庫
現在溫度 -164
高溫警報

液態氮桶SCO2 臍帶血庫-種子庫
低溫警報

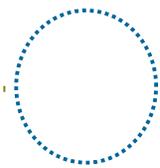
Temp #1: -165C on 1/3/2003 08:00
Temp #1: -167C on 1/3/2003 08:30
Temp #1: -164C on 1/3/2003 09:00

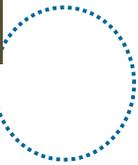
03.一月.2003 08:57:17

液氮槽之線上溫度記錄圖示



03.一月.2003 08:53:25







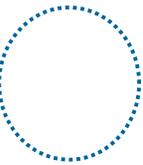
液氮筒

大型液氮槽內部



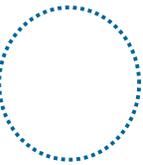
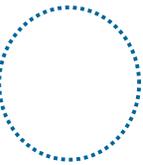
設施

- ▶ 操作室設計和儀器之擺放，首要注意氣流 (air-flow) 之運動方向、人員動線和出入管制、廢棄物處理方式
- ▶ 避免形成氣流之擾亂和死角
- ▶ 二氧化碳培養箱應置於操作室最清潔處，**勿放置於出入口或回風口**
- ▶ 易於清潔
- ▶ 無塵無菌室之規格(class 100, 1000, 10000...)



無塵無菌設計

- HEPA filter(高效能空氣過濾器) :
 - 可將粒徑大於0.5 μm 之浮游微粒子去除99.97%以上之空氣過濾器
- laminar flow(層流):
 - 在固定空間之整體空氣沿平行流線做均勻速度之流動
 - 方式：垂直層流(vertical flow)與水平層流(horizontal flow)
- 規模：無菌室→無菌操作台
- 等級：class 10,000 (culture room) → class 100 (無菌操作台)



無菌操作台

safety laminar flow hood (class I, II, III):

使用過之空氣經由HEPA排放出去

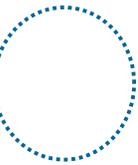
提供無菌環境及保護工作人員(shield and airflow)

等級：

class I：保護工作者優先，提供無菌環境次之

class II：提供無菌環境與保護工作者兼顧，適用於細胞培養

class III：密閉空間，用於高度危險感染物質



無菌操作台(laminar flow hood)

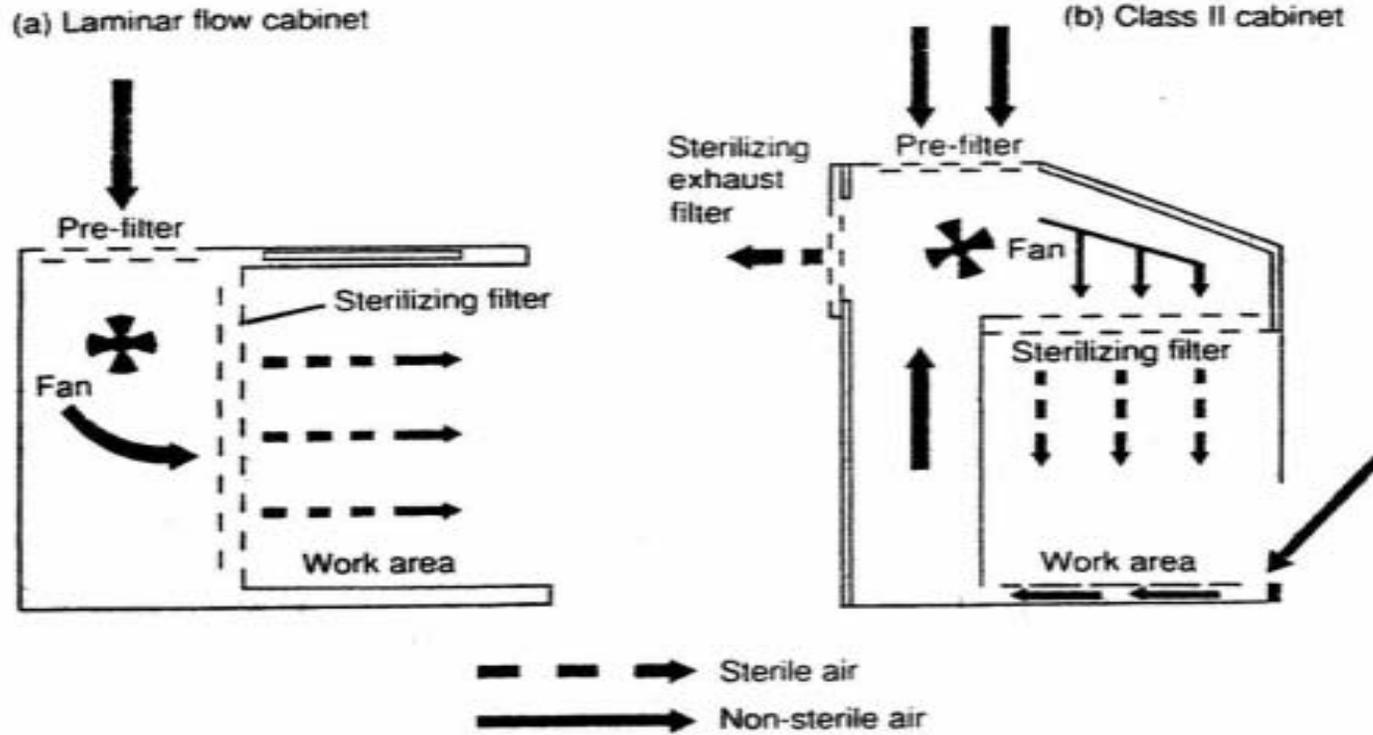
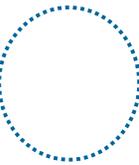


FIGURE . : Air flow diagrams. (a) Horizontal laminar flow cabinet and (b) a Class II recirculating cabinet.



Safety Cabinet

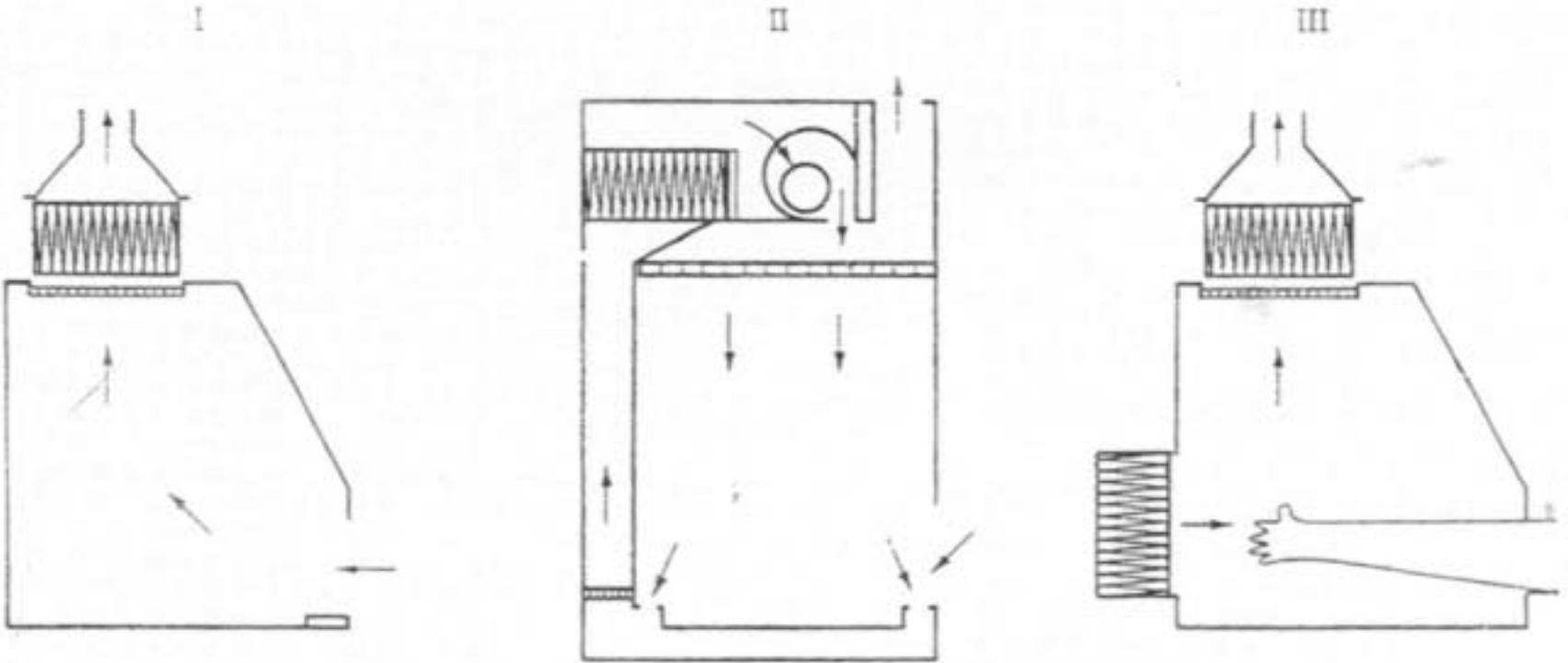
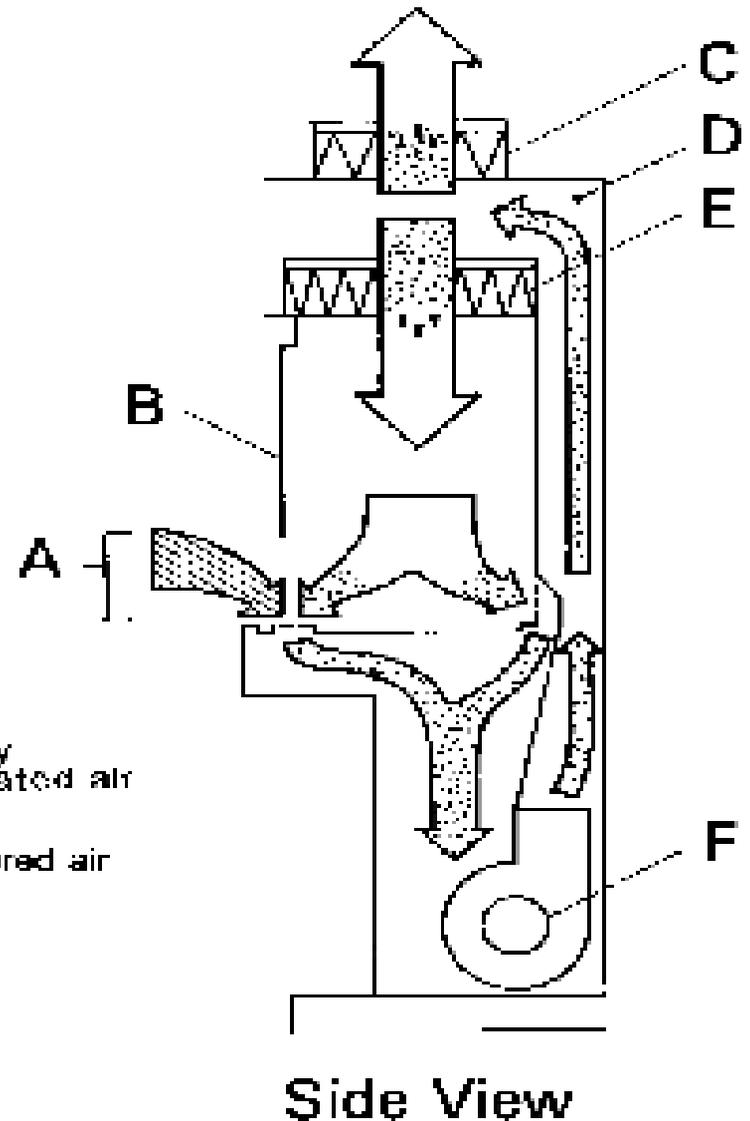


Figure 1A:2.1 Classes of microbiological safety cabinets (types I, II and III).



Class II Type A 生物安全櫃

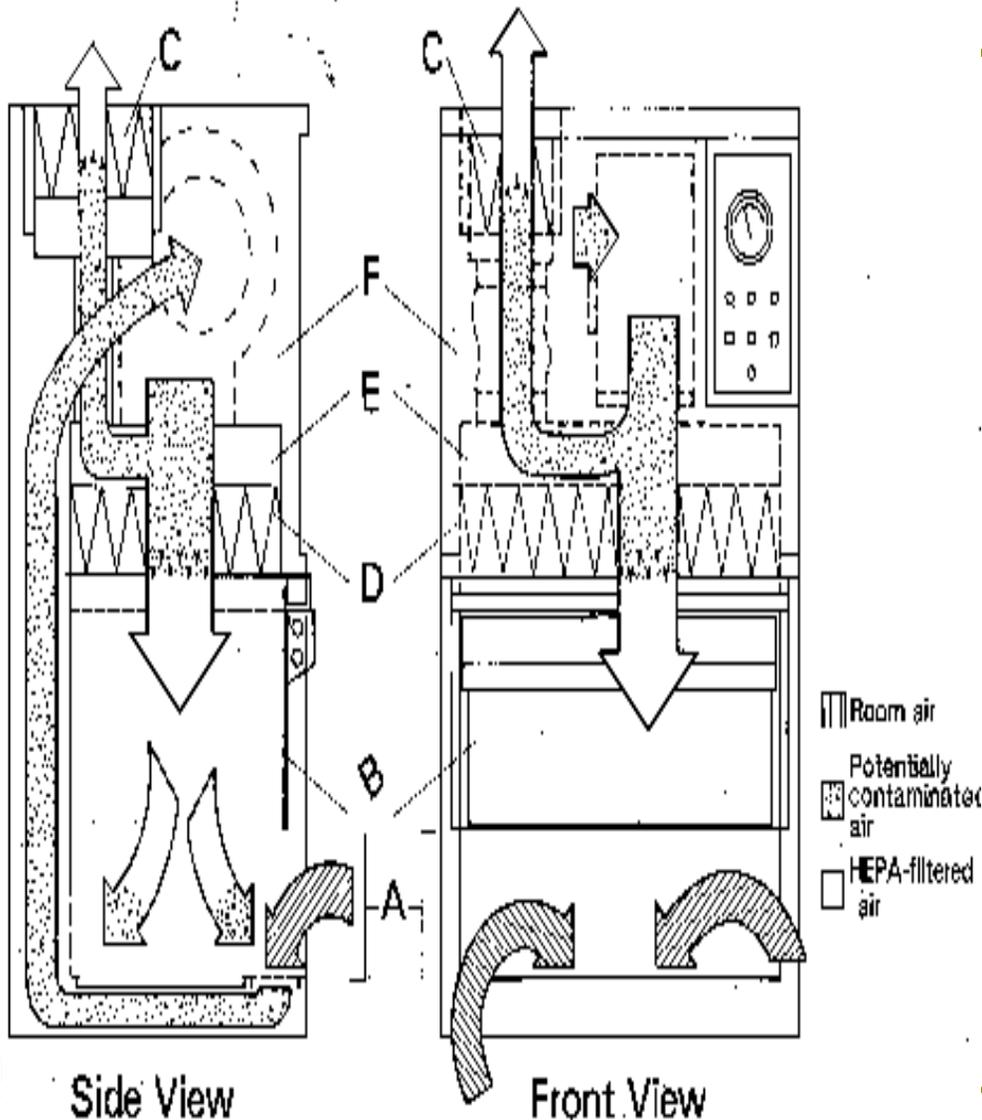
- ✓ 生物安全等級BSL1-3級
- ✓ 層流下吹氣流
- ✓ 裝置HEPA(高效濾棉)
- ✓ 進氣源來自室內空氣
- ✓ 容許70%的過濾空氣循環
- ✓ 最低進流風速75ft/min



資料來源:IOSH91-M302



Class II Type B3 生物安全櫃

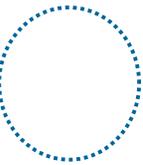
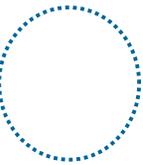


- ✓ 生物安全等級BSL1-3級
- ✓ 層流下吹氣流
- ✓ 裝置HEPA(高效濾棉)
- ✓ 進氣源來自部分室內空氣及其他乾淨氣源
- ✓ 全排式
- ✓ 過濾空氣不循環
- ✓ 最低進流風速100ft/min
- ✓ 風扇機進氣過濾
- ✓ 電力失效interlock
- ✓ 差壓感測及警報裝置
- ✓ 部分化學品的使用
- ✓ 洩漏測試

設備---定期檢測

使用維修記錄卡記錄

- CO₂ incubator:
 - CO₂ 濃度，溫度之校正
 - 水盤：加無菌水，定期更換(1-2 wk)
 - CO₂鋼瓶：CO₂壓力
- waterbath：定期更換水（或加消毒劑）
- 離心機：避免造成不平衡，清潔內部
- 純水供應系統：定期水質檢驗和更換濾材



無菌操作技術原則： 無菌操作台

實驗前：

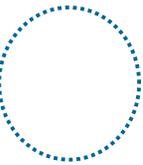
- 紫外燈照射 20-30 min (實驗室亦是)
- 70% ethanol 擦拭無菌操作台面
- 風車先運轉至少 10 min

實驗中：

70% ethanol 擦拭將移入之物品
檯面勿堆放太多物品，勿阻塞前後通氣口
檯面中央為無菌區域，邊緣為非無菌區域
無菌操作檯內不建議使用火焰。

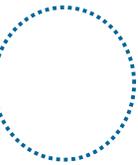
實驗後：

- 移出使用物品，70% ethanol 擦拭桌面
- 10-15 min “clean time” for next experiment



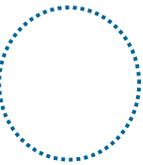
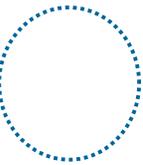
無菌技術操作原則

- 每次操作只處理一種細胞株，不共用相同培養基，注意標籤 --> 避免cellular cross-contamination
- 取用物品：
 - pipette勿碰觸吸管尖頭部或是容器瓶口
 - 勿以傾倒方式取培養基，必須利用pipette
 - 勿在在打開之容器正上方操作實驗
 - 容器打開後，以手夾住瓶蓋並握住瓶身，傾斜瓶身取用，儘量勿將瓶蓋蓋口朝上放置桌面。
 - 避免aerosol產生
- 實驗進行中盡量勿談話



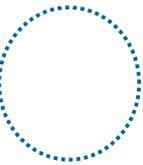
抗生素的使用

- 依實驗目的決定是否添加抗生素
- primary culture: 建議使用抗生素
- 一般菌種中心之細胞培養不加抗生素，只在寄送 flask culture 前才添加。
- 若自其他實驗室引進細胞株，培養初期可依對方實驗室方法加入抗生素，待細胞確定無污染後，大量培養可以不使用抗生素。



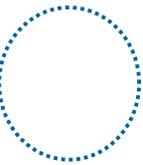
污染處理

-
- 丟棄污染細胞與相關用品
- 找污染原因 (特別是mycoplasma污染)
- 酵母菌及黴菌污染：不易處理，因為spore可經由空氣傳播
- 消毒劑：無菌操作台及工作區域
 - 70% ethanol
 - hypochlorite(漂白水, clorox,)
 - 其他消毒劑，如衛康、萊舒...
- 嚴重無菌室污染：formaldehyde fumigation (甲醛熏蒸) -->
甲醛10 ml per 1m²加熱揮發10-12小時



如何防範微生物之污染

- ⊗ 使用確定沒有污染之細胞
- ⊗ 例行定期檢測
- ⊗ 使用無抗生素培養基
- ⊗ 發現有污染的細胞，立即高壓滅菌處理丟棄
- ⊗ 使用合格的無菌操作台和器具，定期功能檢測
- ⊗ 訓練操作人員並遵守無菌操作技術
- ⊗ 有污染之細胞請勿與純淨之細胞同時操作



Final reminders

- ▶ Water quality
- ▶ serum quality: COA (certificate of analysis)
- ▶ medium preparation
- ▶ cell storage management
- ▶ people training
- ▶ equipment's validation/working properly

