

實驗室細胞之有效管理

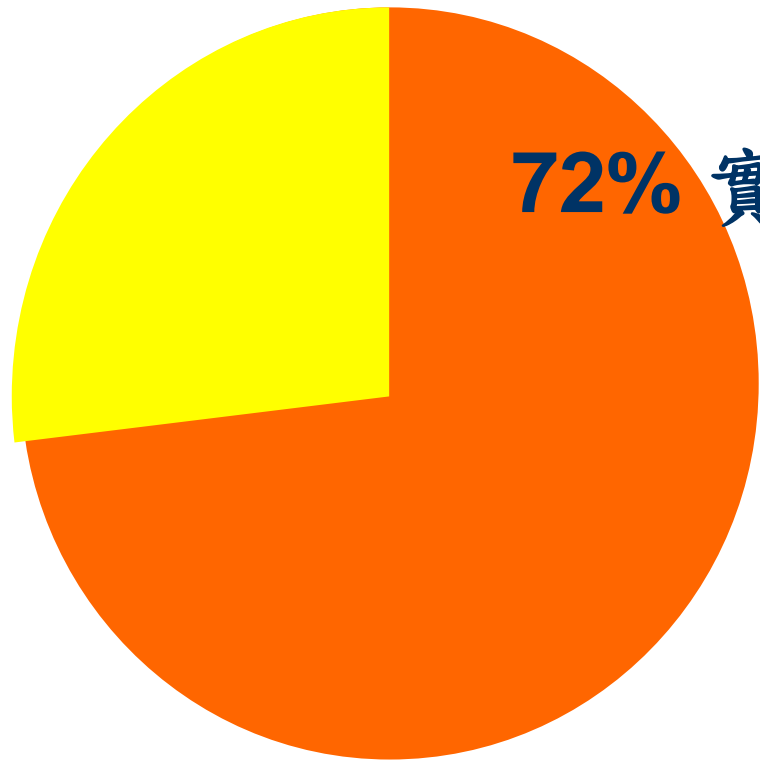
黃效民



食品工業發展研究所

Food Industry Research and Development Institute





72% 實驗室細胞培養問題

微生物污染

冷凍後細胞活化不成

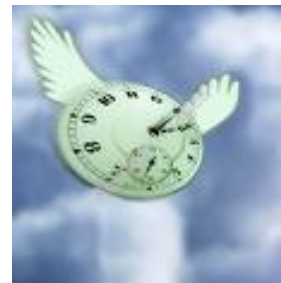
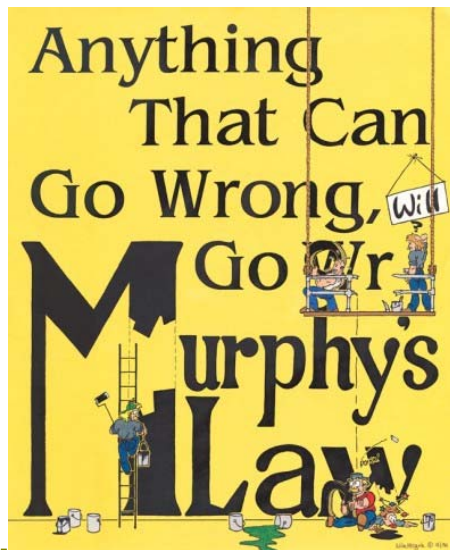
特性改變

液體培養基pH升高



Cell culture management

- ▶ Goal: not to scare you but to inform you!
 - ▶ 降低錯誤的機會
 - ▶ 減少錯誤造成的傷害



3 key questions

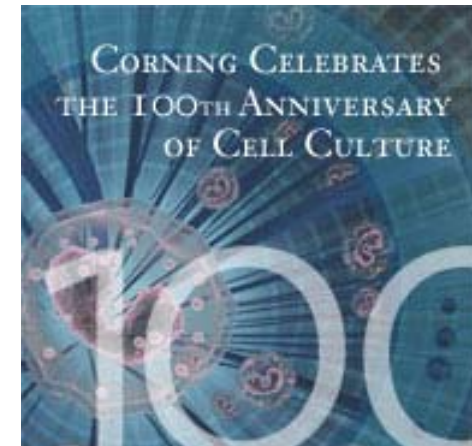
- ▶ What are your cultures worth?
 - ▶ Degree, carrier, company, 數千元...
- ▶ What has or can go wrong?
 - ▶ Murphy's law, cells, equipments, personnel
- ▶ What can you do to prevent or reduce these problems?
 - ▶ Priority, nature, plan, action



4 key targets



- ▶ Healthy, contamination-free cells
- ▶ Happy, functional and reliable cells
- ▶ Reliable freezer, incubators
- ▶ Good records



Skill and Techniques of Cell Culture

- ▶ Growing Happier Cells
- ▶ Management of Cells
- ▶ Culture Contamination
- ▶ Identifying Common Cell Culture Problems
- ▶ Good Aseptic techniques
- ▶ Cell Storage and Cryopreservation
- ▶



2008 Cell Culture WorkShop 細胞培養技術研討會



▶ 上網報名 <http://www.level.com.tw>
完成課程者將頒發 "細胞培養技術受訓證書" !
2種共4場免費課程, 名額有限~



Basic

Basic Knowledge and Skills for Cell Culture

6/5
(四)

AM9:30~PM5:30
林口長庚醫院
復健大樓第一會議廳

課程簡介

- 主講人: 食品工業研究所 生物資源保存及研究中心副主任 黃效民博士
- ▶ Growing Happier Cells/Management of Cells
 - ▶ Cell Storage and Cryopreservation
 - ▶ Culture Contamination
 - ▶ Identifying Common Cell Culture Problems
 - ▶ Good Aseptic Techniques
 - ▶ Choosing the Best Surface (台灣康寧國際部 許世昌經理)

6/12
(四)

AM9:30~PM5:30
中國醫藥大學國際會議廳
(立夫大樓地下一樓)

活動預告

Coming soon

9.18

AM9:30~PM5:30
高雄醫學大學
此場次報名時間將另行通知

Advanced

Technology and Application for HTS/ Cell-based Assay

6/24
(四)

AM8:50~PM5:30
中央研究院
活動中心第一會議室

課程簡介

- ▶ HTS Assay Technology and Application
 - ▶ Cell-based Assay Technology and Application
 - ▶ High Content Screening
 - ▶ A Guide to Small Volume Cell Culture Scale Up*/
Factor Impacting Cell Based Assay Performance*
 - ▶ Growing Cells on Transwell Inserts: Tips & Techniques*
 - ▶ Label-free Drug Screenings
- * English Lecture
- 汎球藥理研究所 劉育志博士
長庚大學 陳華健博士
長庚大學 陳淑貞博士
美國康寧生命科學事業群 Dr. Jeanne Phillips
台灣康寧研發中心 Dr. Connie Wang

- ▶ 主辦單位: 食品工業發展研究所
台灣康寧國際部
- ▶ 協辦單位: 進階生物科技股份有限公司
- ▶ 聯絡方式: 02-2695-9935 分機8664
register@mail.level.com.tw

level
Discovering
new boundaries



CORNING



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, TAF.....



細胞之管理

- ▶ 觀念/操作正確最重要
 - ▶ 無菌觀念/操作
 - ▶ 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



對一般研究人員之建議

- ▶ MCB(5), WCB (10) for ten years' research
- ▶ 2-3 months, less than 10 passages
- ▶ 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



冷凍細胞之 儲存管理

1. 單核細胞(MNC) 2. LN2 3. 種子庫 保存位置圖

Tank: L17 Box: BA42 Pos: 99 Detail

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	CM02515	CM02516	CM02517	CM02518	CM02519	CM02520	CM02521	CM02522	CM02523
2	CM02524	CM02525	CM02526	CM02527	CM02528	CM02529	CM02530	CM02531	CM02532
3	CM02533	CM02534	CM02535	CM02536	CM02537	CM02538	CM02539	CM02540	CM02541
4	CM02542	CM02543	CM02544	CM02545	CM02546	CM02547	CM02548	CM02549	CM02550
5	CM02551	CM02552	CM02553	CM02554	CM02555	CM02556	CM02557	CM02559	CM02560
6	CM02561	CM02562	CM02563	CM02564	CM02565	CM02566	CM02567	CM02568	CM02569
7	CM02570	CM02571	CM02572	CM02573	CM02574	CM02575	CM02576	CM02577	CM02578
8	CM02579	CM02580	CM02581	CM02582	CM02583	CM02584	CM02585	CM02586	CM02587
9	CM02588	CM02589	CM02590	CM02591	CM02592	CM02593	CM02594	CM02595	CM02596

細胞庫研究中心
Technologies Center

庫房管理系統

基本資料 統計

- 員工管理(E)
- 菌株基本資料(I)
- 出入庫型態(E)
- 出入庫原因(R)
- 入庫作業登錄(I)
- 出庫作業登錄(O)

- 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

Office
Microsoft

Microsoft Access - [血液計畫藥品報表-bcr - 報表]

食品工業發展研究所
Food Industry Research and Development Institute
◎病毒轉染建立人類單核細胞株

檢體名稱編號: [Barcode]

品名	規格	單位	備註
細胞	凍存		
凍存液	CM00001		
凍存液	CM00002		
MDC	凍存液	CM00003	
MDC	凍存液	CM00004	
凍存液	CM00005		
凍存液	CM00006		
凍存液	CM00007		
凍存液	CM00008		
凍存液	CM00009		
凍存液	CM00010		
凍存液	CM00011		
凍存液	CM00012		
凍存液	CM00013		
凍存液	CM00014		
凍存液	CM00015		
凍存液	CM00016		
凍存液	CM00017		
凍存液	CM00018		
凍存液	CM00019		
凍存液	CM00020		
凍存液	CM00021		
凍存液	CM00022		
凍存液	CM00023		
凍存液	CM00024		
凍存液	CM00025		
凍存液	CM00026		
凍存液	CM00027		
凍存液	CM00028		
凍存液	CM00029		
凍存液	CM00030		
凍存液	CM00031		
凍存液	CM00032		
凍存液	CM00033		
凍存液	CM00034		
凍存液	CM00035		
凍存液	CM00036		
凍存液	CM00037		
凍存液	CM00038		
凍存液	CM00039		
凍存液	CM00040		
凍存液	CM00041		
凍存液	CM00042		
凍存液	CM00043		
凍存液	CM00044		
凍存液	CM00045		
凍存液	CM00046		
凍存液	CM00047		
凍存液	CM00048		
凍存液	CM00049		
凍存液	CM00050		
凍存液	CM00051		
凍存液	CM00052		
凍存液	CM00053		
凍存液	CM00054		
凍存液	CM00055		
凍存液	CM00056		
凍存液	CM00057		
凍存液	CM00058		
凍存液	CM00059		
凍存液	CM00060		
凍存液	CM00061		
凍存液	CM00062		
凍存液	CM00063		
凍存液	CM00064		
凍存液	CM00065		
凍存液	CM00066		
凍存液	CM00067		
凍存液	CM00068		
凍存液	CM00069		
凍存液	CM00070		
凍存液	CM00071		
凍存液	CM00072		
凍存液	CM00073		
凍存液	CM00074		
凍存液	CM00075		
凍存液	CM00076		
凍存液	CM00077		
凍存液	CM00078		
凍存液	CM00079		
凍存液	CM00080		
凍存液	CM00081		
凍存液	CM00082		
凍存液	CM00083		
凍存液	CM00084		
凍存液	CM00085		
凍存液	CM00086		
凍存液	CM00087		
凍存液	CM00088		
凍存液	CM00089		
凍存液	CM00090		
凍存液	CM00091		
凍存液	CM00092		
凍存液	CM00093		
凍存液	CM00094		
凍存液	CM00095		
凍存液	CM00096		
凍存液	CM00097		
凍存液	CM00098		
凍存液	CM00099		
凍存液	CM00100		

低溫庫房之線上監控

The screenshot displays a software interface for monitoring a cryogenic storage facility. The main area shows a floor plan with various storage units and their current temperatures:

- Left Section (Green background):**
 - Row 1: L16 (-161), L13 (-161), L15, L02, L01, L06, L05
 - Row 2: U1, U2, U3, U4, U5, U6
 - Row 3: L17 (-157), L18 (-165), U7, U8, SC02 (164), SC01 (-165)
 - Row 4: U9, U10, U11, U12
- Middle Section (Blue background):**
 - Upright: L11 (-176), L04, L10, L07 (-148)
 - Horizontal: R06
- Right Section (Green background):**
 - Row 1: R04 (-79), R02 (-79), R05 (-79), R03 (-81), R07 (-79), R08 (-79), R09 (-79), R10 (-81), R11 (-76)
 - Row 2: U13, U14, U15, U16, U17, U18, U19
 - Row 3: U20, U21, U22, U23, U24, U25, U26
 - Row 4: R01 (-80), U27, U28, U29, U30, U31

Below the floor plan, a status bar for the liquid nitrogen storage area shows:

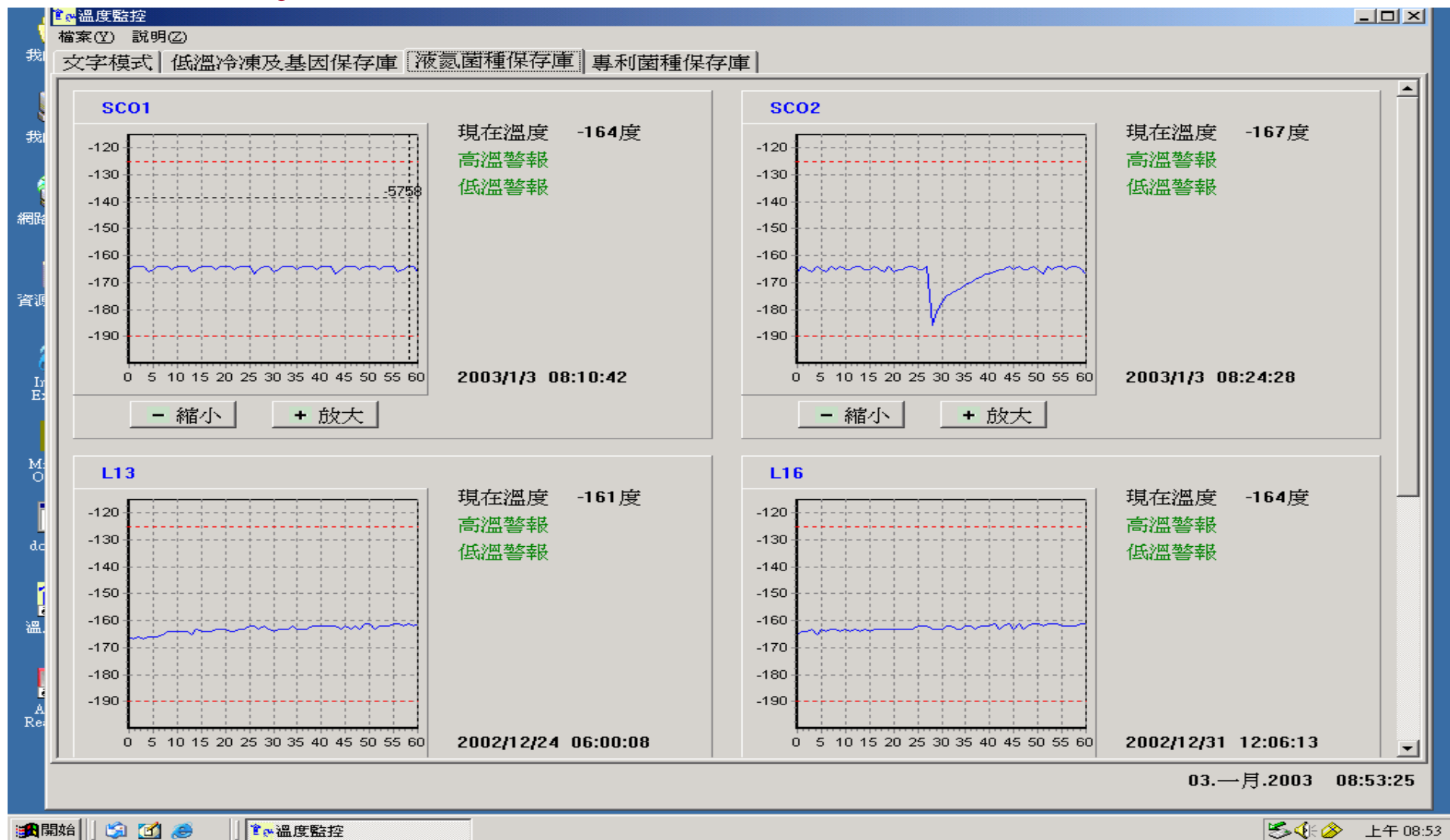
- 液氮菌種保存庫
- 現在溫度 -164
- 高溫警報 (High temperature alarm)
- 低溫警報 (Low temperature alarm)

A log of temperature readings is displayed below the status bar:

- 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

The interface includes a menu bar with options like '檔案(F)', '說明(S)', and '文字模式'. The bottom status bar shows the date and time: 03.一月.2003 08:57:17.

液氮槽之線上溫度記錄圖示









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 um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)



設備---定期檢測

- **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**

- **定期清潔**：**70%酒精...**

- **水浴槽**：定期更換水（可加消毒劑）**最大污染源**

- **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**



無菌操作台(生物安全操作櫃)

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



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
 - 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
- ▶ 一般細胞庫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：~~福馬林熏蒸~~~~福馬林10 ml per 1m²加熱揮發10-12小時~~或請廠商以H₂O₂消毒



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



Excellent reference

- ▶ <http://www.cdc.gov.tw/index1024.htm>
- ▶ [WHO Laboratory biosafety manual 第三版](#)
[中文版](#)
- ▶ 參加細胞庫之訓練課程

