

細胞培養 Cell Culture

黃士維 博士
Shi-Wei Huang Ph. D.

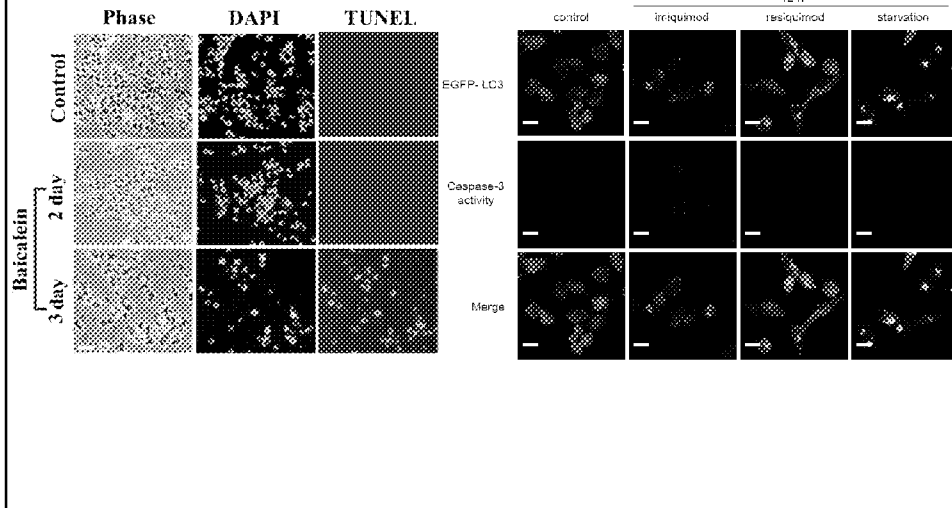
細胞培養之醫學應用

- Immuno-therapy
- Gene therapy
- Transfusion medicine
- Regenerative medicine

Selection of medicine

Ex: Anti-tumor (cytotoxicity)

Ex: AUtophagy (cellular functions)



The characteristics of various cells

一.來源區分

(1).Cell lines (2).Primary cells

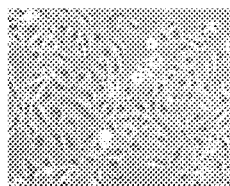
二.生長情形區分

1.貼附性

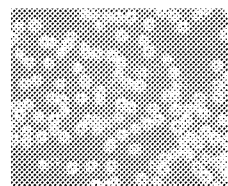
(adhesion)

2.懸浮性

(suspension)



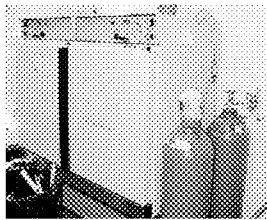
A549



HL-60

細胞培養室之基本配備

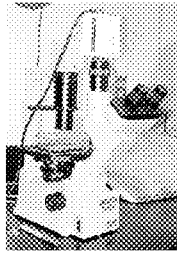
1. 無菌操作台 (Laminar Flow)
2. 5%CO₂ 培養箱
3. 光學顯微鏡
4. 4°C 冰箱
5. 37°C 水浴槽
6. 離心機
7. 液態氮桶



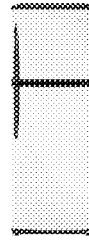
Cell culture incubator



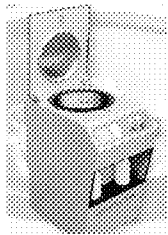
Laminar flow



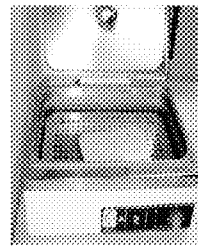
Microscope



Refrigerator



Centrifuger



Water bath

細胞培養之基本概念：

- 1、 培養細胞相關資訊之蒐集及閱讀
- 2、 選用適當之培養基
- 3、 無菌操作步驟
- 4、 解凍細胞及細胞之繼代培養
- 5、 冷凍細胞及細胞之長途運送
- 6、 細胞培養室之維護

培養細胞相關資訊之蒐集及閱讀

選用適當之培養基

Bioresources Collection and Research Center (BCRC)

細胞株資料單

生資中心編號	BCRC 60159		
細胞株名稱	3T3-L1		
細胞株來源	ATCC CL-173		
組織來源	Mouse embryo		
冷凍管容量	1 ml	濃度	1.17×10^6 cells/ml
冷凍日期	2010.03.03	繼代數	P= unknown + 7
存活率	99.2 %	冷凍批號	Lot-01727
生長特性	Adherent		
形態	Fibroblast-like		
培養基	90% Dulbecco's modified Eagle's medium with 4 mM L-glutamine adjusted to contain 1.5 g/L sodium bicarbonate, 4.5 g/L glucose and 1.0 mM sodium pyruvate + 10% bovine calf serum (請使用 calf serum, 而不是 FBS 或其他 serum)		
培養條件	37°C, 5% CO ₂		
冷凍培養基	93% culture medium + 7% DMSO		
培養基更換	Every 2 to 3 days		
繼代培養	<p>移去培養基, 用 PBS 洗滌細胞 1-2 次後移去 PBS, 加入 trypsin-EDTA 溶液, 放在 37°C 作用數分鐘後, 輕拍培養瓶使細胞自瓶壁脫落, 加入含血清之新鮮培養基, 均勻混合後轉移至新的培養瓶中。</p> <p>注意: 請勿培養細胞至全滿 (completely confluent)。繼代培養時應以高度稀釋比例分盤, 否則容易出現具有 reduced contact inhibition 性質之變異細胞。</p>		
繼代稀釋比例	For 75 sq cm flasks use 4×10^5 cells per flask and subculture every 3 days. A saturation density of approximately 50000 cells per sq cm can be reached.		
污染測試	negative for bacteria, fungi, and mycoplasma		

Japanese Collection of Research Bioresources (JCBR)

JCBR 総誌パンフ

発行日: 2007年11月 発行所: 東京大学

JCBR0405 NIH-7

研究資源

000001-0001	ヒト由来	000001	ヒト
000002-0002	ヒト由来	000002	ヒト
000003-0003	ヒト由来	000003	ヒト
000004-0004	ヒト由来	000004	ヒト
000005-0005	ヒト由来	000005	ヒト
000006-0006	ヒト由来	000006	ヒト
000007-0007	ヒト由来	000007	ヒト
000008-0008	ヒト由来	000008	ヒト
000009-0009	ヒト由来	000009	ヒト
000010-0010	ヒト由来	000010	ヒト
000011-0011	ヒト由来	000011	ヒト
000012-0012	ヒト由来	000012	ヒト
000013-0013	ヒト由来	000013	ヒト
000014-0014	ヒト由来	000014	ヒト
000015-0015	ヒト由来	000015	ヒト
000016-0016	ヒト由来	000016	ヒト
000017-0017	ヒト由来	000017	ヒト
000018-0018	ヒト由来	000018	ヒト
000019-0019	ヒト由来	000019	ヒト
000020-0020	ヒト由来	000020	ヒト
000021-0021	ヒト由来	000021	ヒト
000022-0022	ヒト由来	000022	ヒト
000023-0023	ヒト由来	000023	ヒト
000024-0024	ヒト由来	000024	ヒト
000025-0025	ヒト由来	000025	ヒト
000026-0026	ヒト由来	000026	ヒト
000027-0027	ヒト由来	000027	ヒト
000028-0028	ヒト由来	000028	ヒト
000029-0029	ヒト由来	000029	ヒト
000030-0030	ヒト由来	000030	ヒト
000031-0031	ヒト由来	000031	ヒト
000032-0032	ヒト由来	000032	ヒト
000033-0033	ヒト由来	000033	ヒト
000034-0034	ヒト由来	000034	ヒト
000035-0035	ヒト由来	000035	ヒト
000036-0036	ヒト由来	000036	ヒト
000037-0037	ヒト由来	000037	ヒト
000038-0038	ヒト由来	000038	ヒト
000039-0039	ヒト由来	000039	ヒト
000040-0040	ヒト由来	000040	ヒト
000041-0041	ヒト由来	000041	ヒト
000042-0042	ヒト由来	000042	ヒト
000043-0043	ヒト由来	000043	ヒト
000044-0044	ヒト由来	000044	ヒト
000045-0045	ヒト由来	000045	ヒト
000046-0046	ヒト由来	000046	ヒト
000047-0047	ヒト由来	000047	ヒト
000048-0048	ヒト由来	000048	ヒト
000049-0049	ヒト由来	000049	ヒト
000050-0050	ヒト由来	000050	ヒト
000051-0051	ヒト由来	000051	ヒト
000052-0052	ヒト由来	000052	ヒト
000053-0053	ヒト由来	000053	ヒト
000054-0054	ヒト由来	000054	ヒト
000055-0055	ヒト由来	000055	ヒト
000056-0056	ヒト由来	000056	ヒト
000057-0057	ヒト由来	000057	ヒト
000058-0058	ヒト由来	000058	ヒト
000059-0059	ヒト由来	000059	ヒト
000060-0060	ヒト由来	000060	ヒト
000061-0061	ヒト由来	000061	ヒト
000062-0062	ヒト由来	000062	ヒト
000063-0063	ヒト由来	000063	ヒト
000064-0064	ヒト由来	000064	ヒト
000065-0065	ヒト由来	000065	ヒト
000066-0066	ヒト由来	000066	ヒト
000067-0067	ヒト由来	000067	ヒト
000068-0068	ヒト由来	000068	ヒト
000069-0069	ヒト由来	000069	ヒト
000070-0070	ヒト由来	000070	ヒト
000071-0071	ヒト由来	000071	ヒト
000072-0072	ヒト由来	000072	ヒト
000073-0073	ヒト由来	000073	ヒト
000074-0074	ヒト由来	000074	ヒト
000075-0075	ヒト由来	000075	ヒト
000076-0076	ヒト由来	000076	ヒト
000077-0077	ヒト由来	000077	ヒト
000078-0078	ヒト由来	000078	ヒト
000079-0079	ヒト由来	000079	ヒト
000080-0080	ヒト由来	000080	ヒト
000081-0081	ヒト由来	000081	ヒト
000082-0082	ヒト由来	000082	ヒト
000083-0083	ヒト由来	000083	ヒト
000084-0084	ヒト由来	000084	ヒト
000085-0085	ヒト由来	000085	ヒト
000086-0086	ヒト由来	000086	ヒト
000087-0087	ヒト由来	000087	ヒト
000088-0088	ヒト由来	000088	ヒト
000089-0089	ヒト由来	000089	ヒト
000090-0090	ヒト由来	000090	ヒト
000091-0091	ヒト由来	000091	ヒト
000092-0092	ヒト由来	000092	ヒト
000093-0093	ヒト由来	000093	ヒト
000094-0094	ヒト由来	000094	ヒト
000095-0095	ヒト由来	000095	ヒト
000096-0096	ヒト由来	000096	ヒト
000097-0097	ヒト由来	000097	ヒト
000098-0098	ヒト由来	000098	ヒト
000099-0099	ヒト由来	000099	ヒト
000100-0100	ヒト由来	000100	ヒト



Journal of Pharmacology and Therapeutics

European Journal of Pharmacology

Volume 557, Issues 1-3, November 2007

0167-6369/07/\$ - see front matter © 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

Role of JNK and Jun signaling pathway in regulation of human serum paraoxonase 1 gene transcription by berberine in human HepG2 cells

Chun-Hong Tsai, Chih-Mei Chen, Mae-Huei Wang, Chieh-Ting Chen, Chen-Mei Tsai, Shih-Jen Lee

Journal of Pharmacology and Therapeutics

Volume 557, Issues 1-3, November 2007

0167-6369/07/\$ - see front matter © 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Materials and methods

2.1. Materials

Berberine, phenyl acetic acid, thiazinyl, and an anti-48-ethin anti-body were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA). The anti-P38 α antibody was purchased from Abcam (Cambridge, UK). Anti-RSK, anti-p38, anti-phosphorylated-RSK, anti-phosphorylated-p38, anti-phosphorylated-p38, and anti-phosphorylated-c-Jun antibodies as well as 1- β -D-glucosyl-2- β -D-glucopyranosyl-3-O-(3-methylphosphoryl)- β -D-glucopyranoside (Berberine) (B0100) were purchased from Cell Signalling (Beverly, MA, USA). Berberine (1,2,3,4-tetrahydro-8,8-dimethyl-10,11-epoxy-9,10-dihydro-5H-benzofuro[3,2-g]quinoline-5-carboxamide) (B0100) were obtained from Galibiochem (Chiba, Japan). Anti-p38 α was purchased from Santa Cruz (Santa Cruz, CA, USA). Substrate upon RSK and p38 α were obtained from Upstate Biotechnology (Lake Placid, NY, USA). A calcium-1 activity assay kit was purchased from Cell Signalling (Beverly, MA, USA).

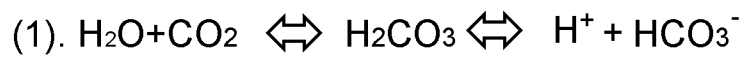
2.2. Cell culture

Human hepatoma HepG2 and Hep3 cell lines were obtained from American Type Culture Collection. Cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) in 96-well plates. For cell growth investigation, cells were seeded at a density of 4×10^4 cells/well in a 96-well plate and incubated for 24 h prior to drug treatment. Various concentrations of berberine were added to culture media for indicated time points. Cell viability was assessed by the Trypan blue exclusion method.

培養基的成分

- Inorganic salts
- Amino acid
- Vitamins
- Others
- *Glucose
- *Nucleotide
- *Pyruvate
- *Indicators-phenol red
- *pH buffer

The role of sodium bicarbonate in culture medium



List of amino acid

Essential amino acid	Nonessential amino acid
Histidine	Alanine
Isoleucine	Arginine
Leucine	Cysteine
Lysine	Glutamate
Methionine	Glutamine
Phenylalanine	Glycine
Threonine	Proline
Tryptophan	Serine
Valine	Tyrosine
	Asparagine
	Selenocysteine

Preparation of culture medium

Dissolve medium powder (add sodium bicarbonate)



Adjust pH



Add water to a fixed volume



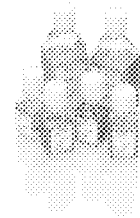
Filter medium



Prepared medium (basal medium)
+ Serum (heat inactivation)
+ penicillin/streptomycin



Cell culture medium



Cell culture serum



Complete medium

血清的成分

- *Protein
- *Polypeptides
- *Hormones
- *Metabolites
- *Nutrients
- *Minerals
- *Inhibitors
- *Unknown materials

血清的功能

- *提供必須營養素
- *含有許多生長因子和激素
- *幫助細胞貼附
- *維持培養環境的穩定

無菌操作步驟

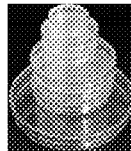
1. 無菌操作基本技術，實驗進行前，無菌室及無菌操作台 (Laminar Flow) 以紫外燈照射30-60分鐘滅菌，以75% ethanol 擦拭無菌操作台面，並開啟無菌操作台風扇運轉數分鐘後，才開始實驗操作。
2. 無菌操作工作區域應保持清潔及寬敞，必要物品，例如試管架、吸管吸取器或吸管盒等可以暫時放置，其他實驗用品用完即應移出，以利於氣流之流通。實驗用品以75% ethanol 擦拭後才帶入無菌操作台內。
3. 小心取用無菌之實驗物品，避免造成污染。例如越過無菌面、勿碰觸吸管尖頭部份或是容器瓶口。

解凍細胞及細胞繼代培養

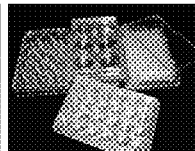
1. Complete medium



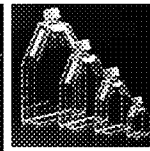
2. Petridish and flask



dish



Plate

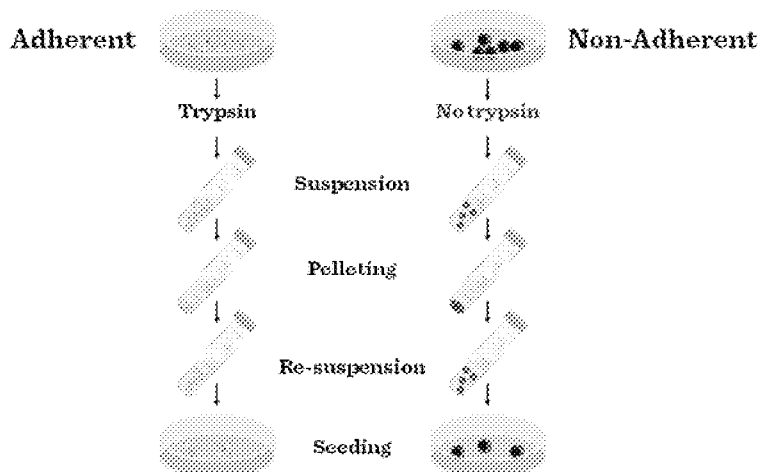


flask

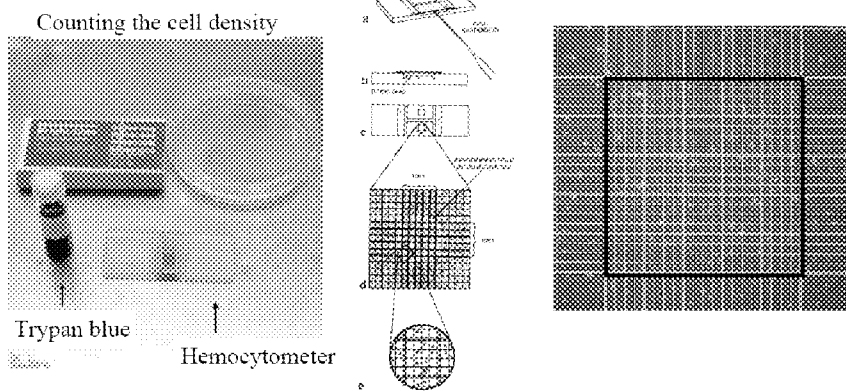
3. Pipette and pipette aid



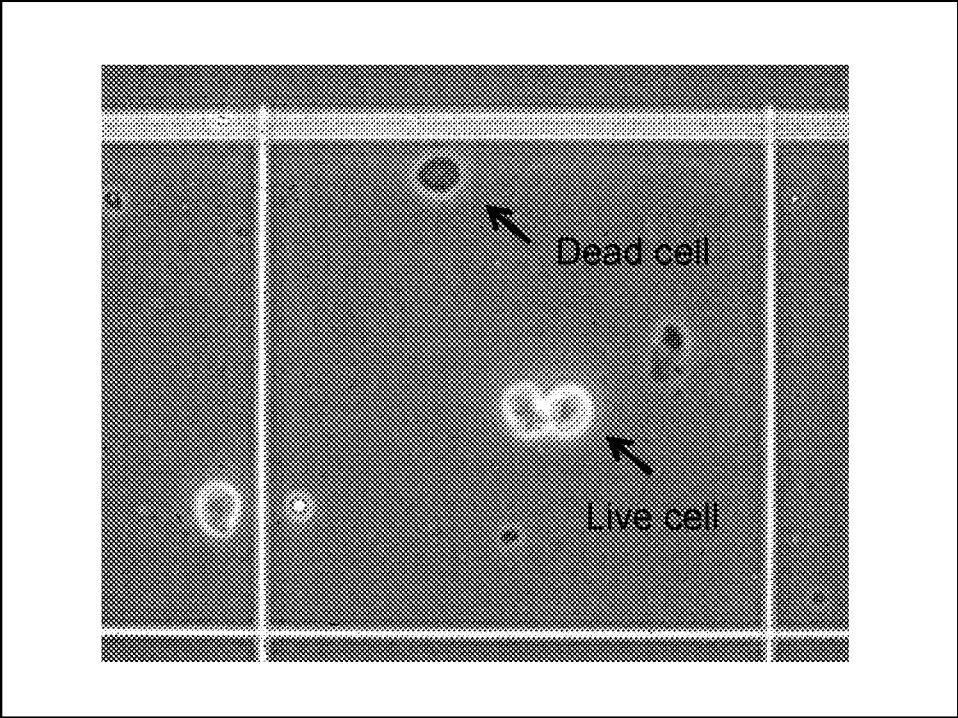
細胞培養



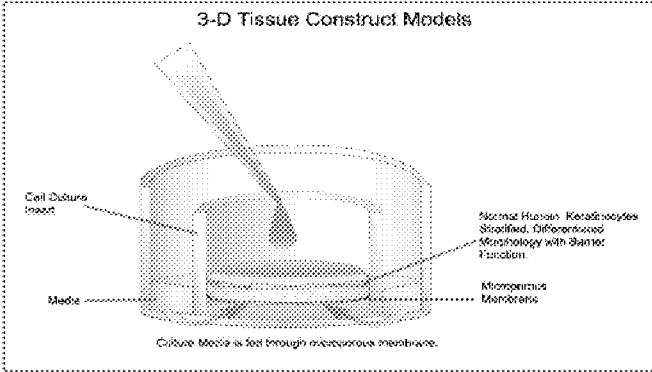
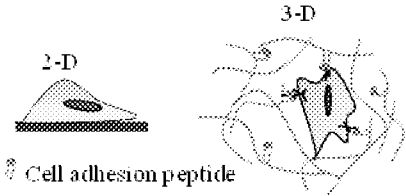
細胞計數



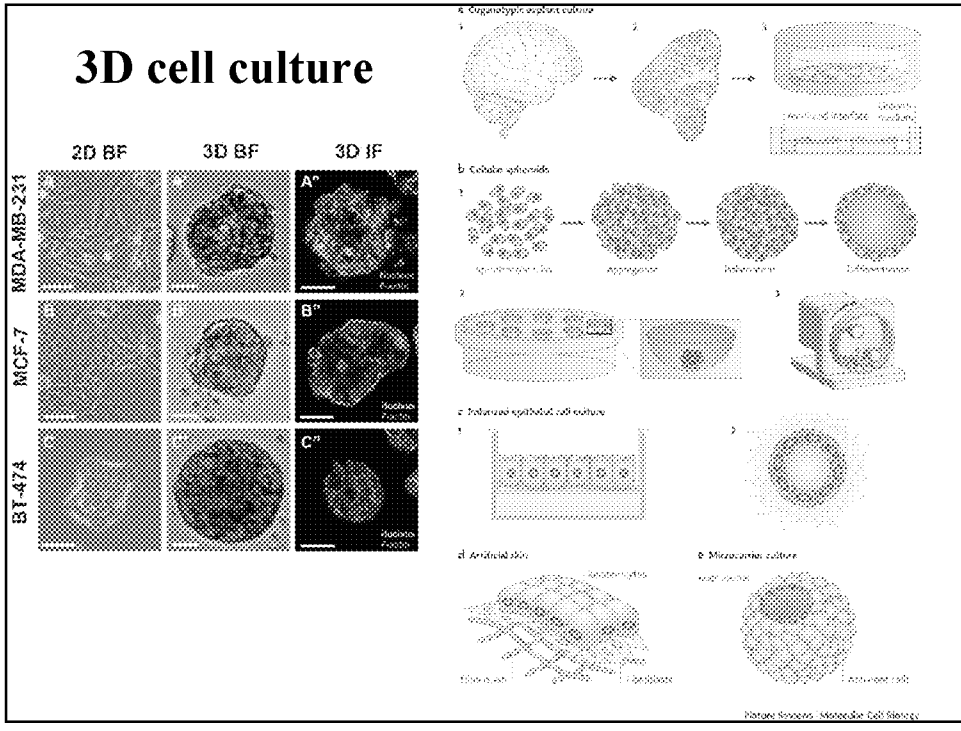
$$\text{Cell numbers (cells/ml)} = \text{counting cell numbers/well} * 10^{-4} \text{ dilution}$$



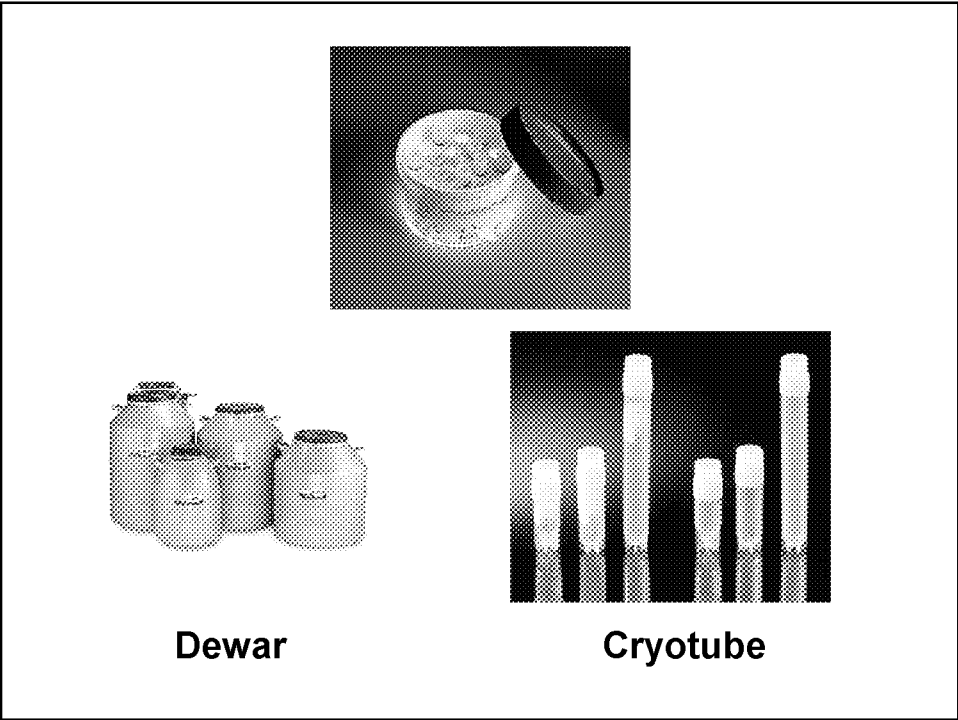
3度立體細胞培養(3D cell culture)



3D cell culture

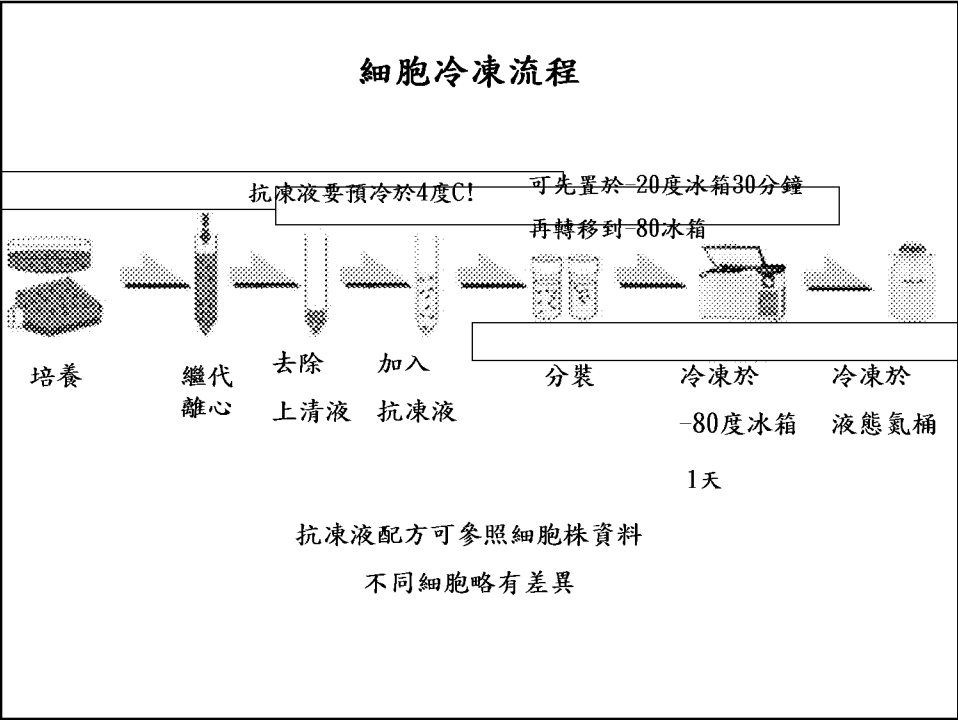


冷凍細胞及細胞之長途運送

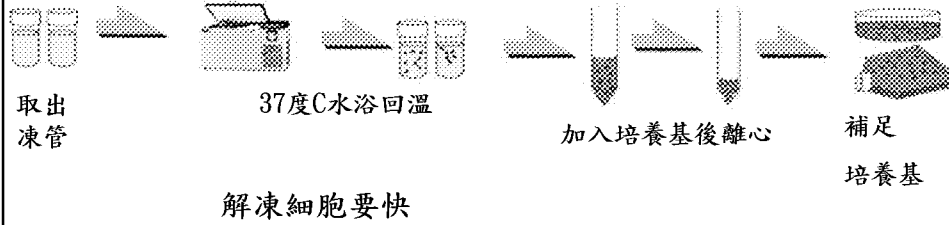


Dewar

Cryotube



細胞解凍流程

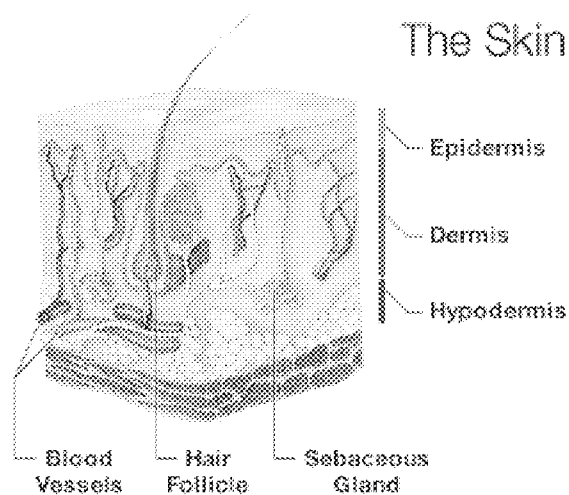


細胞培養室之維護

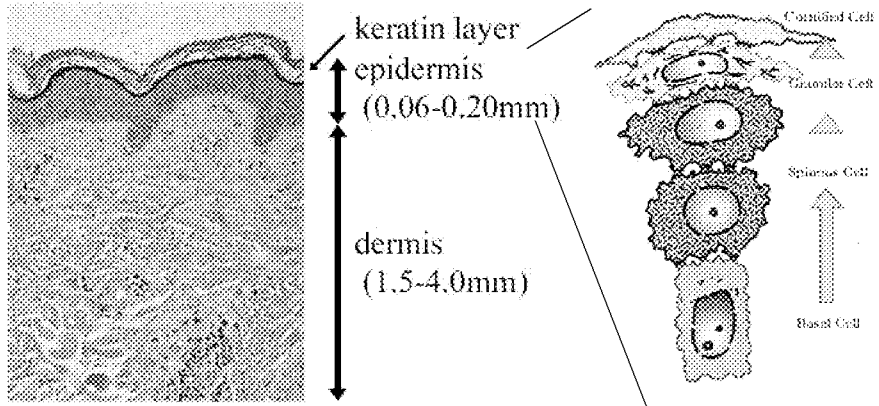
定期檢測項目：

- a. CO₂鋼瓶之CO₂壓力
- b. CO₂培養箱之CO₂濃度、溫度是否正常及水盤有無污染和水盤補充水
- c. 無菌操作台之濾網定期更換

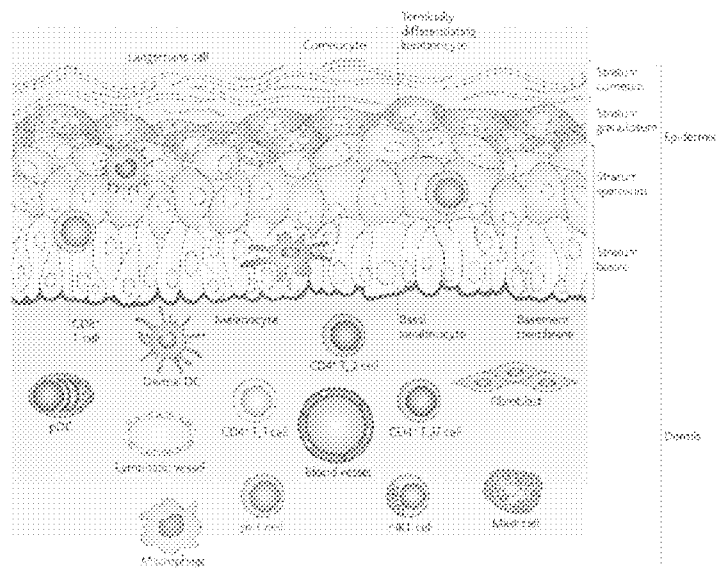
Primary cell culture

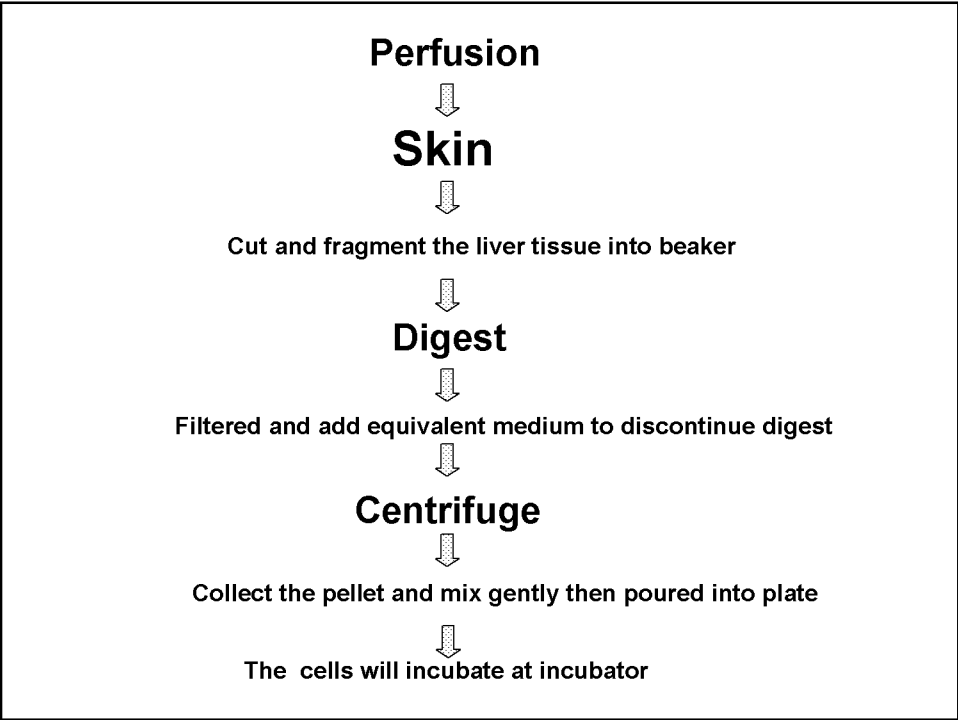


皮膚分化

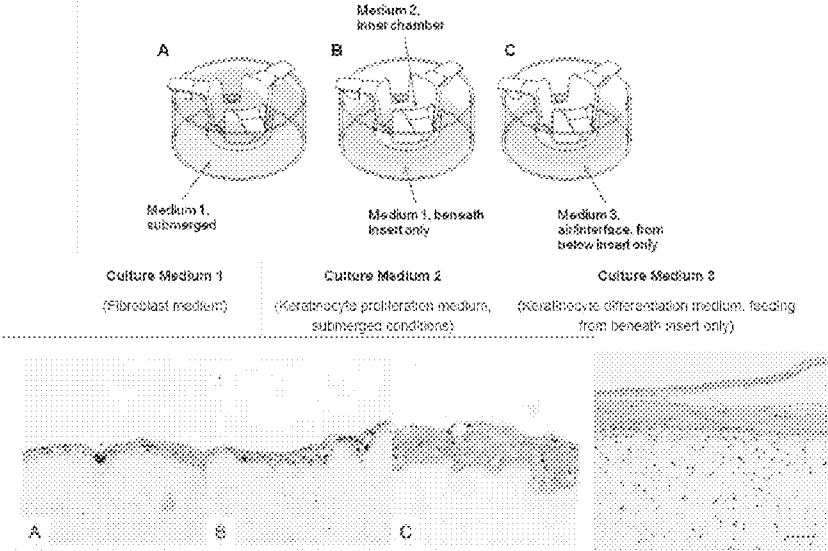


皮膚-細胞種類





3度立體皮膚細胞培養(3D skin cell culture)



細胞培養常見問題

- (1). 冷凍管應如何解凍?
- (2). 細胞冷凍管解凍培養時，是否應馬上去除DMSO?
- (3). 可否使用與原先培養條件不同之培養基或血清?
- (4). 何謂FBS, FCS, CS, HS?
- (5). 細胞培養時應使用多少濃度的CO₂?
- (6). 何時需更換培養基?
- (7). 培養基中是否需添加抗生素?

- (8). 如何繼代附著性的細胞及懸浮性的細胞?
- (9). 冷凍保存細胞的方法。
- (10). 冷凍保存細胞時，冷凍管內需有多少細胞濃度?
- (11). 如何避免細胞污染?
- (12). 培養過程中造成微生物污染的種類與處理方式
- (13). 如何判別細菌污染?
- (14). 如何判別真菌（黴菌）污染?
- (15). 黴漿菌污染的細胞是否能用肉眼看出異狀?

- (16). 黴漿菌污染會對細胞培養有何影響？
- (17). 偵測出有黴漿菌污染時應如何處理？
- (18). 細胞培養箱之水盤該如何清理？
- (19). 為何培養基保存於冰箱中，顏色會偏暗紅，pH值會越來越高？
- (20). 不同品牌的培養盤對細胞培養是否有差異？
- (21). 冷凍管解凍後，細胞數偏少的原因。
- (22). 冷凍管解凍後，細胞死亡率高，存活率不佳的原因。

細胞培養常見之問題與回答(一)

Q1: 冷凍管應如何解凍？

A1: 取出冷凍管後，須立即放入 37°C 水槽中快速解凍，輕搖冷凍管使其在 1 分鐘內全部融化，並注意水面不可超過冷凍管蓋沿，否則易發生污染情形。另冷凍管由液氮桶中取出解凍時，必須注意安全，預防冷凍管之爆裂。

Q2: 細胞冷凍管解凍培養時，是否應馬上去除 DMSO？

A2: 除少數特別註明對 DMSO 敏感之細胞外，絕大部分細胞株（包括懸浮性細胞），在解凍之後，應直接放入含有 10-15ml 新鮮培養基之培養角瓶中，待隔天再置換新鮮培養基以去除 DMSO 即可，如此可避免大部分解凍後細胞無法生長或貼附之問題。

Q3: 可否使用與原先培養條件不同之培養基？

A3: 不能。每一細胞株均有其特定使用且已適應之細胞培養基，若驟然使用和原先提供之培養條件不同之培養基，細胞大都無法立即適應，造成細胞無法存活。

Q4: 可否使用與原先培養條件不同之血清種類？

A4: 不能。血清是細胞培養上一個極為重要的營養來源，所以血清的種類和品質對於細胞的生長會產生極大的影響，來自不同物種的血清，在一些物質或分子的量或內容物上都有所不同，血清使用錯誤常會造成細胞無法存活。

Q5: 何謂 FBS, FCS, CS, HS？

A5: FBS (fetal bovine serum) 和 FCS (fetal calf serum) 是相同的意思，兩者都是指胎牛血清，FCS 乃錯誤的使用字眼，請不要再使用。CS (calf serum) 則是指小牛血清，HS (horse serum) 則是指馬血清。

Q6: 培養細胞時應使用 5% 或 10% CO₂？或根本沒有影響？

A6: 一般培養基中大都使用 HCO₃⁻/CO₂/H₂O 作為 pH 的緩衝系統，而培養基中 NaHCO₃ 的含量將決定細胞培養時應使用的 CO₂ 濃度。當培養基中 NaHCO₃ 含量為每公升 3.7g 時，細胞培養時應使用 10% CO₂；當培養基中 NaHCO₃ 為每公升 1.5g 時，則應使用 5% CO₂ 培養細胞。

細胞培養常見之問題與回答(二)

Q7: 何時須更換培養基?

A7: 視細胞生長密度而定, 或遵照細胞株基本資料上之更換時間, 依時更換培養基即可。

Q8: 培養基中是否須添加抗生素?

A8: 除於特殊篩選系統中外, 一般正常培養狀態下, 培養基中不應添加任何抗生素。

Q9: 附著性細胞繼代時所使用之 trypsin-EDTA 濃度? 應如何處理?

A9: 一般使用之 trypsin-EDTA 濃度為 0.05% trypsin-0.53mM EDTA.4Na。第一次開瓶後應立即少量分裝於無菌試管中, 保存於 -20°C , 避免反覆冷凍解凍造成 trypsin 之活性降低, 並可減少污染之機會。

Q10: 懸浮性細胞應如何繼代處理?

A10: 一般僅需持續加入新鮮培養基於原培養角瓶中, 稀釋細胞濃度即可, 若培養液太多時, 可將培養角瓶口端稍微抬高, 直到無法容納為止, 分瓶時取出一部份含細胞之培養液至另一新的培養角瓶, 加入新鮮培養基稀釋至適當濃度, 重複前述步驟即可。

Q11: 欲將一般動物細胞離心下來, 其離心速率應為多少轉速?

A11: 欲回收動物細胞, 其離心速率一般為 $300\times g$ (約 1,000 rpm), 5-10 分鐘, 過高之轉速, 將造成細胞死亡。

Q12: 細胞之接種密度為何?

A12: 依照細胞株基本資料上之接種密度或稀釋分盤之比例接種即可, 細胞數太少或稀釋的太多亦是造成細胞無法生長之一重要原因。

Q13: 細胞冷凍培養基之成份為何?

A13: 動物細胞冷凍保存時最常使用的冷凍培養基是含 5-10% DMSO (dimethyl sulfoxide) 和 90-95% 原來細胞生長用之新鮮培養基均混合之, 注意: 由於 DMSO 稀釋時會放出大量熱能, 故不可將 DMSO 直接加入細胞液中, 必須使用前先行配製完成。

Q14: DMSO 之等級和無菌過濾之方式為何?

A14: 冷凍保存使用之 DMSO 等級, 必須為 Tissue culture grade 之 DMSO (如 Sigma D2650), 其本身即為無菌狀況, 第一次開瓶後應立即少量分裝於無菌試管中, 保存於 4°C , 避免反覆冷凍解凍造成 DMSO 之裂解而釋出有害物質, 並可減少污染之機會, 若要過濾 DMSO, 則須使用耐 DMSO 之 Nylon 材質濾膜。

細胞培養常見之問題與回答(三)

Q15: 冷凍保存細胞之方法?

A15: 冷凍保存方法一: 冷凍管置於 4°C 30-60 分鐘 \rightarrow (-20°C 30 分鐘) \rightarrow -80°C 16-18 小時 (或隔夜) \rightarrow 液氮槽 vapor phase 長期儲存。

冷凍保存方法二: 冷凍管置於已設定程式之可程式降溫機中每分鐘降 1.3°C 至 -80°C 以下, 再放入液氮槽 vapor phase 長期儲存。

-20°C 不可超過 1 小時, 以防止冰晶過大, 造成細胞大量死亡, 亦可跳過此步驟直接放入 -80°C 冰箱中, 推存活率稍微降低一些。

Q16: 細胞欲冷凍保存時, 細胞冷凍管內應有多少細胞濃度?

A16: 冷凍管內細胞數目一般為 1×10^6 cells/ml vial, 融合瘤細胞則以 5×10^6 cells/ml vial 為宜。

Q17: 應如何避免細胞污染?

A17: 細胞污染的種類可分成細菌、酵母菌、黴菌、病毒和黴菌。主要的污染原因為無菌操作技術不當、操作室環境不佳、污染之血清和污染之細胞等。嚴格之無菌操作技術、清潔的環境、與品質良好之細胞來源和培養基配製是滅菌污染之最好方法。

Q18: 如果細胞發生微生物污染時, 應如何處理?

A18: 直接滅菌後丟棄之。

Q19: 黴菌 (mycoplasma) 污染的細胞, 是否能以肉眼觀察出異狀?

A19: 不能, 除極有經驗之專家外, 大多數遭受黴菌污染的細胞株, 無法以其外觀分辨之。

Q20: 黴菌污染會對細胞培養有何影響?

A20: 黴菌污染幾乎可影響所有細胞之生長參數, 代謝及研究之任何數據, 故進行實驗前, 必須確認細胞為 mycoplasma-free, 實驗結果之數據方有意義。

Q21: 檢出細胞株有黴菌污染時, 該如何處理?

細胞培養常見之問題與回答(四)

A21: 直接倒掉後去裝，以免污染其他細胞株。

Q22: CO₂ 培養箱之水盤如何保持清潔？

A22: 定期（至少每週一次）以無菌蒸餾水或無菌去離子水更換之。

Q23: 為何培養基保存於 4° C 冰箱中，顏色會偏暗紅色，且 pH 值會越來越偏鹼性？

A23: 培養基保存於 4° C 冰箱中，培養基內之 CO₂ 會逐漸溢出，造成培養基越來越偏鹼性。而培養基中之酚紅指示劑（通常為 phenol red）的顏色也會隨鹼性增加而更偏暗紅。培養基偏鹼之結果，將造成細胞生長停滯或死亡。若培養基偏鹼時，可以通入無菌過濾之 CO₂，以調整 pH 值。

Q24: 各種細胞培養用的 dish, flask 是否均相同？

A24: 不同廠牌的 dish 或 flask，其所 coating 的 polymer 不同，製造程序亦不同，雖對大部分細胞沒有太大之影響，惟少數細胞則可能因使用廠牌不同之 dish 或 flask 而有顯著之生長差異。

Q25: 購買之細胞冷凍管經解凍後，為何會發生細胞數目太少之情形？

A25: 研究人員在冷凍細胞之培養時出現細胞數目太少，大都是因為離心過程操作上的失誤，造成細胞的物理性損傷，以及細胞流失。建議細胞解凍後不要立刻離心，應待細胞生長隔夜後再更換培養基即可。

Q26: 購買之細胞死亡或細胞存活率不佳可能原因？

A26: 研究人員在細胞培養時出現存活率不佳，常見原因可歸納為：

- 培養基使用錯誤或培養基品質不佳。
- 血清使用錯誤或血清的品質不佳。
- 解凍過程錯誤。
- 冷凍細胞解凍後，加以洗滌細胞和離心。
- 懸浮細胞誤認為死細胞。
- 培養溫度使用錯誤。
- 細胞置於 -80° C 太久。

Q27: 收到之冷凍管瓶身破裂，瓶蓋有裂紋，或瓶蓋脫落之原因？

A27: 冷凍管瓶蓋裂紋，或瓶身破裂，可能是因為操作者夾取冷凍管時用力不當，造成冷凍管裂損，建議使用止血鉗小心夾取。另冷凍管瓶蓋鬆動或鬆脫，乃因熱脹冷縮之物理現象，冷凍管有可能因此而造成細胞污染，故冷凍管於放入和取出液氮桶時，均應立刻將冷凍管再一次扭緊。

教教學研究部細胞培養共同實驗室使用申請表

申請日期： 年 月 日

申請者姓名		單位	
		職稱	
單位主管簽章			
研究內容			
使用期限	自民國 年 月 日至 年 月 日		

使用期限以一年為上限，續借得重新申請

實驗室借用者同意：

1. 在實驗室使用日誌上簽名
2. 遵守儀器使用規則，以維持儀器正常運作。
3. 除非經過管理者(徐士蘭, 分機4037/ 謝淑鐘, 分機4037)同意，不任意移動實驗室儀器。
4. 管理者得應實驗需要同意移入相關儀器。移入實驗室之儀器，一律視為公用。
5. 儀器若有損壞，立即告知管理者。
6. 維持儀器與實驗室整潔。
7. 不惡意佔用儀器與空間
8. 若有違反以上條例經查屬實，教研部依情節輕重，可隨時取消實驗室使用權

實驗室使用者簽名 _____ 年 月 日
 實驗室負責主管簽章 _____ 年 月 日
 教學研究部主任簽章 _____ 年 月 日

Thanks for your attention !