

回归基础：

适当维护与保养您的细胞培养箱

Mary Kay Bates, M.S. 全球细胞培养专家；Jennifer D’Onofrio博士 应用学专家

Molly Love Parrucci CO₂培养箱全球产品经理；Douglas Wernerspach 恒温产品& CO₂培养箱全球业务总监，Thermo Fisher Scientific

当今在世界各地不同的实验室有许多不同的 CO₂ 培养箱，他们有着一些相似之处。您信任工作的前提基于您所培养的细胞和培养箱。拥有一个精心设计、运行良好的培养箱，意味着工作没有后顾之忧。在这样的培养箱中，细胞会生长良好，不易污染，并且培养箱容易清洗和维护。

每位细胞培养箱的使用者都需要了解几个重要的问题，以确保培养箱处于最佳状态工作。这里提供的信息将帮助您避免常见的错误。请注意，尽管这些建议普遍适用于任何 CO₂ 培养箱，我们仍建议您查阅您的用户手册，以确保按照制造商的推荐的最佳方法。



放置 CO₂ 培养箱

培养箱的放置位置可以改变它的性能。**通风，气流，室温，阳光直射**都可以影响温度和湿度功能。

当安装一个 CO₂ 培养箱，只能由底部的两侧抬起 CO₂ 培养箱，禁止从正面和背面抬起，永远不要从门的位置抬起培养箱。不要将培养箱直接在地面上。需要使用一个支架。如果培养箱直接放在地面上，每次门打开时产生的空气流动会直接扫起污垢、灰尘和污染物进入培养箱。如果需要当堆叠培养箱，应该只堆叠同类品牌的培养箱。堆叠不同的培养箱，由于没有机械固定，会有培养箱翻倒或滑脱的危险。

接下来，**确保培养箱的四周有足够的空间**。利于通风和接入电源线和连接器，包括气体连接。尽可能把培养箱放置在远离公共区域，但要避免可能有真菌生长的潮湿、湿润的角落。确保设备避免空气流通和其他气流，因为这些气流可直接污染——携带污垢和灰尘进入培养箱。**不要将培养箱放置在阳光直射下**，因为外部温度波动可影响抗冷凝系统。最后，确保培养箱前后和侧方水平——通过调整调平脚或支架。

安装

每个培养箱关于连接和编程的模式是不同的，但也有一些适用于所有培养箱的一般准则。开始正确地安装培养箱将有助于为您的细胞提供最佳的培养条件。

培养箱正确放置之后，清洁和消毒培养箱内部，搁板和搁板座，以及通风管道（如果适用）（请参阅下面的清洁建议）。消毒后，按照制造商的指示安装这些和任何其它内部组件。

注意：如果有自动加热消毒/杀菌程序，可以跳过手动消毒步骤，只需运行自动程序——假定程序已经被验证可以去除公认的生物指示物。一种自动化高温程序还省去了高压灭菌任何内部部件的需要。值得一提的是，最近的 Thermo Scientific VIOS 系列产品具有高温循环，不需要拆除探头就可运行此循环。如果使用的是早期的型号和许多其他制造商的都必须先去除传感器。

当培养箱清洁、消毒过，货架配件到位，您可以安装任何额外的可选部件，如氧传感器或 HEPA 过滤器。

Thermo Fisher Scientific 公司的腔体内 HEPA 过滤系统每 60 秒将过滤整个腔室的空气量，每次开门之后 5 分钟内在室内会建立 ISO-5 的洁净室空气质量¹。注意：不是位于所述腔室内部的 HEPA 过滤器将不会遇到与细胞相同的条件，并不能提供保证相同的水平。处理 HEPA 过滤器和气体传感器必须非常小心，因为它们很容易损坏。

如果您拥有水套式培养箱，确保水套中装满水。并且，用无菌蒸馏水填充水盘注水高度到离顶部 1/2 英寸（1.25 厘米）。保持水盘满是很重要的，不变的湿度和最佳生长条件。

现在，使用电子产品和按照制造商的指南，设定温度，高温值，低温值，CO₂ 与 O₂ 设定值，以及适当的报警。如果您拥有一台带 iCAN 接口的 Thermo Scientific 二氧化碳培养箱，您可以设置数据记录参数。根据您的设置，iCAN 会收集数据进行长达一个星期的存储，或者导出到 Microsoft Excel。这个信息不仅对 GMP 监测，而且对查明问题是非常有用的。

CO₂ 监测

有两种二氧化碳气体传感器。第一个是为 T/C（热导率）传感器。Thermo Scientific 的培养箱提供 T/C 的传感器是非常稳定、准确和经济的。经久耐用，物美价廉和功能强大的 T/C 传感器是最流行的 CO₂ 控制方法。而 IR（红外线）传感器更适合包括 GMP（良好操作规范）等相关应用的监测，或当培养箱门在短时间内需要反复打开；一些制造商将传感器设计为放置在培养箱外面，以避免在灭菌过程中需要去除它们；这不是一个好的选择，因为外部传感器与细胞将面临不相同的条件。因此，这使得培养箱无法对影响细胞生长的变化迅速作出反应。



CO₂ 气体连接

Thermo Scientific 培养箱的连接 CO₂ 钢瓶，必须使用在高压气瓶的出口阀上备有二级的二氧化碳压力调节器。这是因为我们的培养箱输入压力必须保持在 15±5psi (1 Bar)，使 CO₂ 控制系统正常运作。简单的单级调节无法保持这种压力，这将导致二氧化碳的浓度控制不精准。

我们建议使用工业级的气体，至少 99.5% 纯度，因为在气体中的杂质可以对细胞产生负面影响。CO₂ 气体钢瓶不应该包含虹吸管，并备有二级的二氧化碳压力调节器，并设定到培养箱中的输入压力在 15psi (1bar)。连接管道到空气过滤器，然后到培养箱的背面标有锯齿状的接头，一定要使用软管夹，并检查是否漏气，否则将可能对您和其他实验人员造成危险。当培养箱已正常运行 24 小时，用 NIST（美国国家标准与技术研究院）或其他机构校验的温度计校准温度，并用富赖特二氧化碳测定仪或外部 IR 测量计检查 CO₂。



添加额外的设备

一些研究人员想要添加的电气设备，如摇床，旋转器或搅拌器到 CO₂ 培养箱。最大的问题在于，这些设备的散热将导致培养箱的内部温度升高，并且培养箱电子的补偿希望将应对这些额外的热量。摇床产生振动和热量，因此摇床的转速设置不得超过 120rpm，以尽量减少影响贴壁细胞附着和生长。如果确实要在培养箱内使用相关设备，**需购买 Thermo Scientific 的专用摇床 88881102**，或考虑购买配置有冷却盘管和冷水机组的水套培养箱，这将弥补产生的额外热量。

作为摇床的替代，Thermo Scientific 的 Heracell 240i 提供滚瓶组件，其不产生热量。每一个替代的架子，这样您就可以在里面添加多达 4 个设备，给您更多的培养灵活性。

减少污染

实验室的洁净度对于减少培养基被污染概率至关重要。实验室中的灰尘和污垢随着人们在房间走动或打开和关闭的门的间隙散布在空气中。一般室内空气中含有每立方米 100~1000 的微生物，这其中大部分来自于生活在我们的皮肤的万亿正常菌群。这意味着，每次您打开培养箱的门，污染物都可以进入。所以重要的是通过**经常清洁实验室，至少每月一次或两次**，以减少实验室的污染物和灰尘。清洁和消毒生物安全柜，水浴，离心机和显微镜。消除冰箱和冰柜内或周围的纸板，因为纸板可以弄湿，然后滋生真菌。不要将物品放在培养箱的顶部，因为物品周围的灰尘和污垢可以在一开门产生的空气流被扫进室内。请记住清理实验室角落以及和设备上下有灰尘可以聚集的地方。



培养箱消毒剂

许多研究者问：哪些消毒剂可以在 CO₂ 培养箱使用？事实是有许多可供选择的消毒剂，但不是所有的都对细胞安全。一些**强力消毒剂散发烟气进入培养箱，影响细胞生长**。这些烟雾含有的 VOC（挥发性有机化学物质），可以诱导热休克和其他应激蛋白的表达。普通实验室化学品，如**苯酚，异戊醇和 β-巯基乙醇都是 VOC**，而且实验室清洁产品和消毒剂，甚至地板清洁剂和蜡都产生有害气体。总之，如果那些使你感觉不好的强烈气味，对于细胞培养同样不利。实验者越来越关注 VOC 对细胞培养的危害性了。Thermo Scientific 部分培养箱可以选配去除 VOC 的特制 HEPA 滤膜。

赛默飞技术团队研究和测试了一些不同类型的消毒剂。我们寻找的消毒剂满足以下条件：对各种微生物效果广泛，同时对培养箱组件无害（无腐蚀性）。所有的这些测试，**最符合我们要求的化合物是季铵盐消毒剂**。这种消毒剂可以非常方便购买到。例如 Lysol No Rinse（前身 Roccall-D），Conflikt（北美）和 Fermicidal-D（欧洲）。使用 2% 浓度季铵盐消毒液。消毒培养箱内部，并作为水盘的消毒添加剂³。必须强调，禁止使用含漂白剂的清洁剂。含氯漂白剂及其氧化活性衍生物会腐蚀不锈钢和铜。此外，这些化学物质对细胞毒性很大！



清洁培养箱

保持培养箱正常运作，避免细胞污染，需要定期清洁培养箱，这项工作很辛苦，但非常必要和有效。仔细按照以下步骤清洁培养箱，有利于减少污染，保持细胞生长良好。如果您选型的培养箱具有自动高温消毒功能，将有效地消除细菌和真菌，而不需要使用消毒剂。定期清洁培养箱还是必要的工作，以清溢出的液体或灰尘。

1. **取出培养箱中的培养物。**如果清洗时间不长，可以将其保存在干净，无菌的容器中，保持其温度。关闭培养箱，包括关闭供气阀。
2. **取出所有隔板，隔板支架，以及所有附件、空气管道。**清空水盘并用干净的无绒布擦干。
3. **用温和的肥皂水清洁所有的内表面，管道，隔板，隔板支架，内门，风扇和门封条。**使用温和的洗洁精擦拭，去除所有隐藏的角落和缝隙中污垢、灰尘。圆角设计的培养箱更利于清洁工作。
4. **用蒸馏水冲洗箱体内壁和部件，并用干净的无绒布再一次擦干。**
5. **用稀释的季铵盐消毒剂擦拭内壁和部件。**用 70%酒精擦拭以除去任何剩余的消毒剂痕迹。再次强调，一定要擦到所有的角落，并记得安好门封条，更换内部零件。
6. **加热培养箱，让培养箱完全干燥。**这应该只需要花一点时间，所以不要让门开着——那只会重新引入新的灰尘和污物！
7. **如果选型的培养箱具备自动消毒功能，请立即运行。**在周期完成之后，用无菌蒸馏水填充储水器，并打开气阀。
8. **记得清洗培养箱外壁，以消除可能进入的污垢和微生物。**如果培养箱的顶部非常脏，当打开培养箱门灰尘很可能进入，所以清洁顶部是很重要的。用无绒布蘸温和的肥皂水。然后用干净的布蘸清水擦拭干净。用干净的干布擦干外面。特别要注意每个人都接触的门把手。不要使用任何液体或喷雾清洁剂清洁触摸屏显示器。而需要使用干的超细纤维布来清洁这些。

就是这样，就大功告成了！当培养箱达到设定的条件下，将培养物放回到培养箱中。

我们经常被问“怎么清理 100%纯铜培养箱？”您可以使用与不锈钢相同的步骤来清洁铜，包括温和的肥皂水，其次是 70%的乙醇擦拭。同样可以选择使用季铵盐消毒剂，但不是必须，因为纯铜自身就具有杀菌能力。

调整水的重要性

为了提供您所培养细胞所需的适当湿度，我们建议只用无菌蒸馏水。自来水含有少量的氯会腐蚀不锈钢或纯铜。此外，自来水可能含有大量细菌和矿物质。由于细胞生长培养基中的盐和矿物质是精确平衡的，过多的矿物质将导致细胞生长受到影响。

去离子水或一级超纯水不可以使用。它会腐蚀不锈钢，因为水中含有非常少的离子，它将从不锈钢，纯铜，玻璃门，和其他培养箱部件中获得离子。反渗透水可能在质量方面千差万别，如果起始水是 500 ppm（百万分之一），成品水可能是 50ppm，但如果起始水有 150ppm，成品水可能是 15ppm。

我们的技术团队对水质进行广泛的测试。根据这些测试和考虑延长培养箱的寿命，我们建议的**无菌蒸馏水，pH 为 7-9，电导率 1-20 微西门子（电阻率 50K-1M 欧）**。因为无菌蒸馏水可能 pH 值过低，所以

一定要进行测试。

如果实验室只有去离子水或超纯水，建议使用电阻 1-10 兆欧姆/厘米的水。确保 pH 为 7-9，使用之前要消毒。有时实验室公共管路提供去离子水或一级超纯水，实际上来自初始蒸馏，所以只要满足我们制定的参数，这样的水就是可以使用的。

如果没有蒸馏水，选择在培养箱中使用一级超纯水或去离子水，并加碳酸氢钠在水中以提高 pH 值和添加一些离子。但它必须是无菌盐溶液，并且确保水的最终 pH 处于 7-9 的范围。



Thermo Scientific
Barnstead Classic Still

CO₂ 校准

您可以校准自己的 CO₂，但也有几个点您应该知道的。如果您有 T/C 传感器，**确保任何校准开始于早上，因为它可提供至少 12 小时不间断的平衡，以确保稳定的温度和湿度。**由于 T/C 测定工作与温度和湿度相结合，保持水盘满是重要的。如果水用完，将有可能影响 T/C 传感器校准。**Thermo Scientific VIOS 系列 CO₂ 培养箱 T/C 传感器具有湿度补偿探头，将非常有利于 T/C 传感器校准。**

对于 Heracell 培养箱，“Autostart”循环将自动将传感器归零。同时，Heracell 培养箱将自动补偿可能影响室内气体浓度的压力变化。

对于可控氧浓度的三气培养箱而言，**必须先校准 O₂，使之在校准 CO₂ 之前稳定下来。**因为改变氧会改变 CO₂ 校准。

应该多久校准一次？您可以每月使用富赖特二氧化碳测定仪或外部红外测试仪对 CO₂ 浓度校准。但是，如果您正确地维护培养箱，并保持水盘满，只需要每年定期校准几次，例如，每季度一次。请记住，如果您有任何疑问，可以联系 Thermo Fisher Scientific 的售后服务专家。

一般维护

除了需要偶尔检查和校准 CO₂ 外，对于持续的维护培养箱性能需要做的事情很少。如果您选择具有 HEPA 过滤器的培养箱，应每六个月到一年更换一次 HEPA 过滤器。过滤器的寿命将取决于使用培养箱的人数和它的整体清洁和实验室以及制造商的设计。

同时每六个月到一年更换一次进气过滤器(CO₂ 气体进入培养箱的过滤器)，过程只需按照厂家的建议，或者安排一个合格的维修专家来做。

您应该多久运行热灭菌周期？答案取决于您实验室平常的洁净度，有多少人使用同一个培养箱，多久打开门一次，以及过夜关闭培养箱是否方便。大多数用户使用此功能的频率在每月到每半年一次。

保持水盘中水的高度是培养箱日常维护的重要注意事项之一。如果水盘水用完，将非常不利于您的细胞的生长，因为当水变干，湿度下降，导致水从培养基中蒸发。当湿度过低，原本平衡的盐，矿物质，氨基酸等在生长培养基中物质浓度过高，将导致细胞中毒和死亡⁴。如前文所述，过低的湿度不仅危害细胞生长，还极可能损坏 CO₂ 传感器。



References:

1. Thermo Scientific. Importance of Class 100 Air in a CO₂ Incubator. Thermo Scientific 2009, WPCO₂Class100 1109.
2. United States Department of Labor, Occupational Safety & Health Administration. OSHA Technical Manual (OTM) Section III: Chapter 2. TED 01-00-015, 1999.
3. Freshney, RI. Culture of Animal Cells. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, Inc., 2010.
4. Esser, P and Weitzmann, L. Evaporation From Cell Culture Plates. Thermo Scientific 2011, TILSPNUNCBU02 0111.

thermoscientific.com/CO2

©2014Thermo Fisher Scientific Inc.版权所有。所有其他商标均为 Thermo Fisher Scientific Inc.及其子公司的财产。规格，条款和价格可能有所变化。并非所有产品在所有国家提供。请咨询当地的销售代表了解详情。

澳大利亚+61397574300	印度免费电话 1800837422	俄罗斯+78127034215
奥地利+431408010	印度+912267162200	西班牙/葡萄牙+34 932230918
比利时+3253734241	意大利+320295059552	瑞士+41444541222
中国 8008105118 或 +4006505118	日本+81358261616	英国/爱尔兰+448706099203
法国+33228032180	荷兰+31765795555	美国/加拿大+18669843766
德国免费国内长途 08001536376	新西兰+6499806700	其他亚洲国家+85228854613
德国国际+496184600090	北欧/波罗的海/独联体国家 +358 932910200	没有列出国家+496184600090

TNCO2CAREFEED 0514