

无菌操作技术及注意事项

1、玻璃器皿的消毒和清洁

(1)新购玻璃器皿的处理

新购玻璃器皿应用热肥皂水洗刷，流水冲洗，再用 1%~2% 盐酸溶液浸泡，以除去游离碱，再用水冲洗。对容量较大的器皿如试剂瓶、烧瓶或量具等，经清水洗净后应注入浓盐酸少许，慢慢转动，使盐酸布满容器内壁数分钟后倾出盐酸，再用水冲洗。

(2)污染玻璃器皿的处理

①一般试管或容器可用 3% 煤酚皂溶液或 5% 石炭酸浸泡，再煮沸 30 分钟，或在 3%~5% 漂白粉澄清液内 4 小时，有的亦可用肥皂或合成洗涤剂洗刷使尽量产生泡沫，然后用清水冲洗至无肥皂为止。最后用少量蒸馏水冲洗。

②细菌培养用的试管和培养皿可先行集中，用 $1\text{kg}/\text{cm}^2$ 高压灭菌 15~30 分钟，再用热水洗涤后，用肥皂洗刷，流水冲洗。

③吸管使用后应集中于 3% 煤酚皂溶液中浸泡 24 小时，逐支用流水反复冲洗，再用蒸馏水冲洗。

④油蜡沾污的器皿，应单独灭菌洗涤，先将沾有油污的物质弃去，倒置于吸水纸上， 100°C 烘干半小时，再用碱水煮沸，肥皂洗涤，流水冲洗。必要时可用二甲苯或汽油去油污。

⑤染料沾污的器皿，可先用水冲洗，后用清洁或稀盐酸洗脱染料，再用清水冲洗。一般染色剂呈碱性，所以不宜用肥皂的碱水洗涤。

⑥玻片可置于 3% 煤酚皂溶液中浸泡，取出后流水冲洗，再用肥皂或弱碱性煮沸，自然冷却后，流水冲洗。被结核杆菌污染或不易洗净的玻片，可置于清洁液内浸泡后再冲洗。

2、无菌器材和液体的准备

将玻璃器具中的培养皿、培养瓶、试管、吸管等按上述方法洗净烘干后，用一洁净纸包好瓶口并把吸管尾端塞上棉花，装入干净的铝盒或铁盒中，于 120°C 的干燥箱中干燥灭菌 2 小时，取出备用。

对于手术器械、瓶塞、工作服以及新配制的 PBS 洗液，则采用高压蒸气灭菌法，即在 15 磅的条件下，加热 20 分钟。而对于 MEM 培养液、小牛血清和消化液等需用 G_5 或 G_6 滤器负压抽滤后使用。

3、无菌操作过程

在无菌操作过程中，最重要的是要保持工作区的无菌、清洁。因此，在操作前 20~30 分钟要先启动超净台和紫外灯，并认真洗手和消毒。在操作时，严禁喧哗，严禁用手直接拿无菌物品，如瓶塞等，而必须用消毒的止血钳、镊子等。培养瓶应在超净台内操作，并且在开启和加盖瓶塞时需反复用酒精灯烧。对于吸管应先用手拿后 1/3 处，戴上胶皮乳头，并用酒精灯烧烤之后再吸液体。

4、常用清洁液的配制法

(1)重铬酸钾清洁液：

可根据不同需要，选用下列的任何一种浓度。

配 方	1	2	3	4	5
重铬酸钾 (g)	80	60	200	60	100
粗浓硫酸 (ml)	100	90	500	460	800
水 (ml)	1000	750	500	300	200

先将重铬酸钾溶于水中，再慢慢加入浓硫酸。注意，此时可产生高热，应防止容器破裂。重铬酸钾清洁液除污力强，腐蚀性大，应避免接触皮肤和衣服。为防止吸收空气的水分而变质，此液应贮存于带盖的容器中。如清洁效力较差，可再加入少量重铬酸钾及浓硫酸，还可继续使用。直到液体变蓝绿色，即不能再用。

配制重铬酸钾清洁液时，宜用耐高温的陶瓷缸或耐酸搪瓷或塑料容器。使用玻璃器皿时，应特别注意防止产生高热而破裂，切忌用量筒来配制。

(2)磷酸三钠 将其配成 5%~10% 水溶液，可用于洗涤玻璃器皿上的油污，但经常使用腐蚀玻璃，使器皿表面模糊、毛糙。

(3)硝酸清洁液 将其配成 50% 水溶液，可用于清洁微量滴定筒。

(4)乙二胺四乙酸二钠 (EDTA 钠盐) 将其配成 5%~10% 水溶液，可洗脱粘附于玻璃器皿内壁的白色沉淀物。

(5)尿素溶液 尿素是溶解蛋白质的良好溶剂，适用于洗涤粘附有血液血清等蛋白质的吸管、试管等。