

# 动物细胞培养

## 【实验目的】

1. 树立无菌操作概念，掌握细胞培养过程中的无菌操作技术；
2. 学习 HeLa 细胞传代、冻存、复苏、细胞计数等基本操作；
3. 熟悉超净台、二氧化碳培养箱及倒置显微镜等仪器的使用。

## 【背景介绍】

从生物体中取出某种组织或细胞，模拟体内生理条件，在人工培养条件下使其生存、生长、繁殖或传代，这一过程称为细胞培养（cell culture）。细胞体外培养始于 1907 年，Harrison 取两栖类胚的神经管组织块做悬滴培养，观察到细胞的增殖和神经元的分化。

细胞培养可分为原代培养和传代培养，任何动物细胞培养都需从原代细胞培养做起。直接从体内获取的组织细胞进行首次培养为原代培养。动物组织的细胞，如幼年的心肌、肾、卵巢、精巢等组织的细胞较易于培养，神经细胞培养比较困难。从动物体取组织后，需用酶处理将组织块分散成单细胞，与一定的培养基混合后培养。一般细胞在几小时内贴附在培养容器壁，并开始有丝分裂。当细胞长得过于致密之后就要将细胞消化分散成单个，并进一步分散稀释后到更多的容器中培养，这就是细胞传代。细胞传代是细胞培养中最基础的操作。

原代培养的细胞一般传至 10 代左右就不易传下去，细胞生长出现停滞，多数细胞衰老死亡。极少数度过“危机”继续存活的细胞，一般传至 50 代以后又要出现危机，不能再传下去。这种传代有限的体外培养细胞称为有限细胞系（finite cell line）。1961 年，海佛利克在研究中发现，正常的人类细胞在体外培养条件下只能分裂大约 50 多次，此后细胞群体停止分裂，衰老死亡。人们把海佛利克所观察到的细胞停止分裂前所能分裂的次数限制称为“海佛利克极限”（Hayflick limit）。在培养过程中如果有部分细胞发生遗传突变，具有了癌细胞无限的增殖特性，就有可能成为在体外培养条件下能无限制传代培养的细胞，即永生细胞系（infinite cell line）。最早被培养成功的人的永久细胞系是 HeLa 细胞，1951 年由乔治·盖伊（George Gey）等人从一位美国黑人妇女海瑞塔·拉克斯（Henrietta Lacks）的宫颈癌组织分离培养成功。HeLa 取于原患者海瑞塔·拉克斯姓名前两字母，多年来 HeLa 细胞已成为医学研究中十分重要的工具。从单细胞克隆培养，或通过某些方法从某细胞系中分离出单个细胞培养形成的带有特殊遗传标记或性质的细胞称为细胞株（cell strain）。

体外培养的细胞，不论是原代细胞还是传代细胞，一般不能保持体内原有细胞形态。贴壁生长细胞大体上有两种基本形态：成纤维样细胞（fibroblast-like cell）和上皮样细胞

(epithelial-like cell)。此外少数细胞在体外培养是悬浮生长，包括一些取自血、脾或骨髓的培养细胞，形态为球形。

从成功让 HeLa 细胞在实验室培养瓶中无限繁殖开始，细胞培养的技术一直在飞速发展，现已成为实验室常用的研究方法和生物工程的生产手段，如具有临床应用发展前景的干细胞培养、培养干细胞移植或在体外定向诱导分化后的干细胞移植、试管婴儿等都离不开细胞培养技术；体外分化器官用于机体修复也是目前研究发展迅猛的方向。

要成功培养离体的细胞，核心就是要给它提供一个合适生长的环境：包括支持其生长的培养基，提供适宜的温湿度等条件的设备，另外非常重要的是为保护其不受微生物污染，要有相应的设施和操作规范。细胞培养程序多而复杂、培养条件要求严格。离体细胞的生长受培养温度、培养液成分、pH 等许多因素的影响，无菌操作是细胞培养成败的关键之一。在体外培养中，任何同细胞相接触的有害物质（微生物、细胞碎片、非营养的化学成分等）都会影响细胞的生长。在细胞培养的实验中，最重要的就是无菌操作的概念，要对实验中所有用具药品以及环境是否洁净的情况心里有数，知道实验过程中如何操作能尽可能地避免污染。

本次实验将通过 HeLa 细胞的传代、冻存、复苏、计数，学习细胞培养的基本操作方法；熟悉细胞培养的各种相关设施和操作规范。

## 【实验准备】

1. 实验材料：培养的 HeLa 细胞。

2. 试剂：

(1) 培养基：89% DMEM 高糖培养液、10% 血清、1%青链霉素双抗。培养液的配方是为细胞在有 5~10%CO<sub>2</sub> 的条件下设计的，而空气中并不含有如此高的 CO<sub>2</sub>，培养液中的碳酸体系在低于 5~10%CO<sub>2</sub> 条件下会失去原有的平衡，故而引发培养液的 pH 变碱，因此，要尽量避免培养液长时间与空气接触。

(2) 消化液：0.25% 胰蛋白酶。因 Ca<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup>和血清可以降低胰蛋白酶的活性，所以配制胰蛋白酶溶液通常选用乙二烯四乙酸二钠(EDTA-Na)平衡盐溶液。用 0.22 μm 孔径滤膜过滤除菌，分装成小瓶(1~5ml / 瓶)，可取一瓶放在 4℃ 备用，其他小瓶置于-20℃ 保存。

(3) 磷酸盐缓冲液 (PBS)：PBS 在体外细胞培养中应用非常广泛，主要用于漂洗组织与细胞，以供给它们水分和各种离子，维持一定的渗透压。同时，它也可以用于溶解培养用的试剂或药物等。PBS 液(0.01 mol / L, pH7.2)的配制：0.2 g KCl, 0.2 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 8.08 g NaCl, 2.89g Na<sub>2</sub> HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O，加蒸馏水至 1000ml。

(4) 冻存液：培养基加 10% DMSO。

(5) 75% 酒精，95% 酒精等。

### 3、仪器设备和用具：

(1) CO<sub>2</sub> 恒温培养箱：各类的培养箱都是提供一个箱体内部模拟形成一个类似细胞或组织在生物体内的生长环境，如温度、湿度、光照等。动物细胞培养条件为 37℃，相对湿度 95%，5% CO<sub>2</sub>。细胞生长需要 pH 稳定在 7.2-7.4，而细胞代谢产生 CO<sub>2</sub>，随着 CO<sub>2</sub> 释放量的增多，CO<sub>2</sub> 溶于水后所形成的 H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 后培养基会变酸，因此培养基中常加入 NaHCO<sub>3</sub> 与 H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 构成一个缓冲系统来维持培养基中的 pH。但 NaHCO<sub>3</sub> 具有释放 CO<sub>2</sub> 的倾向，在空气加入 CO<sub>2</sub> 可以抑制 NaHCO<sub>3</sub> 释放 CO<sub>2</sub>，从而维持培养基中的缓冲系统。

(2) 洁净工作台或生物安全柜：洁净工作台，通常称超净台，其工作原理是通过风机将空气吸入，经高效过滤器过滤。将过滤后的洁净空气以垂直或水平气流的状态送出，使操作区域持续在洁净空气的控制下，以形成无菌的高洁净的工作环境。一般在使用前 15 分钟打开洁净工作台紫外灯，对洁净台内部进行紫外照射灭菌。工作时，打开风机，关闭紫外灯，打开照明灯准备工作。注意使用时仅操作所必需的清洁无菌物品可进入洁净台内，平常也应保持洁净台内清洁。洁净工作台起到的作用是提供一个相对无菌的环境保护实验细胞不受污染，一般生物安全 1 级的实验室用普通的洁净工作台即可。但在进行致病性病原微生物的实验，实验室级别为二级时，需要用到洁净级别较高的生物安全柜，利用负压的净化工作台，正确使用可保护工作人员、受试样品并防止交叉污染的发生。生物安全柜的使用操作和洁净工作台不同，使用时注意。

(3) 倒置显微镜：细胞培养室都配备有倒置显微镜用于日常培养细胞状态观察。倒置显微镜 (inverted microscope) 成像原理和正置显微镜一样，只是物镜与照明系统的位置颠倒。物镜在载物台之下，照明系统在载物台之上。载物台和照明系统之间的工作空间较大，可将培养有活细胞的培养皿放置在载物台上观察。

(4) 细胞培养皿：培养细胞需要生长在特定的容器中，常用的有细胞培养瓶、细胞培养皿和多孔板等。如果是用玻璃材质则需用洗液浸泡清洗干净，细胞才能贴壁。现在多用塑料的培养皿，市售的一次性细胞培养皿内部底面经过处理，一般用具有一定生物功能的材料如多聚赖氨酸、明胶、胶原蛋白等进行预涂层，以利于细胞贴附生长。

除上述细胞培养必备的重要仪器和用具外，还要用到高压灭菌锅、水浴锅、离心机、酒精灯等，不再详细介绍。

## 【实验过程】

### 1. HeLa 细胞传代培养

将培养的细胞以适当比例转移到分装到更多容器中扩大培养，就是细胞传代培养。通过传代扩增细胞数量，也可在传代时按实验要求进行数量控制、分片等为后续实验准备。如果细胞一直在一个容器中生长不传代，贴壁细胞会在培养成致密单层，如不及时进行传代，细胞将逐渐走向衰老、死亡。传代培养过程如下：

(1) 取一皿静置培养的细胞在倒置显微镜下观察，生长良好的细胞上清液清亮、悬浮物少、细胞边缘折光性好、均质而透明、胞内颗粒少、无空泡和脂滴；细胞生长不良则上清悬浮物多、细胞边缘不清晰、胞质中颗粒多、出现空泡和脂滴等。如细胞生长良好，已长成致密单层，即可进行传代。

(2) 将培养皿放入超净工作台，吸去细胞培养液，加入适量 PBS 使 PBS 覆盖住培养皿底部，慢速晃动培养皿，使 PBS 清洗细胞。之后吸出 PBS，加入 0.3-0.5 ml 0.25% 胰蛋白酶，轻轻转动使酶液浸润整个细胞层，置于室温下或 37 °C 培养箱中进行消化。HeLa 细胞在 37 °C 的消化时间一般为 3-5 min。消化过程中可以把培养瓶放在倒置显微镜下进行观察，当细胞突起回缩、细胞间隙增大、细胞近乎缩成圆形，立即终止消化。

(3) 终止反应：吸出消化液，立即加入一定量的培养液，反复吹打贴壁细胞，确保培养皿底各处细胞均被吹打脱离，制成细胞悬液。如在吹打之前细胞已经产生大面积脱落，表明酶液消化时间过长，此时不能吸出消化液，否则就丢失了细胞，而应该直接加入培养液吹打悬浮，将悬液转入离心管中离心洗去消化液，之后加培养液将细胞沉淀重新悬浮。

(4) 调整细胞浓度，按适当的比例传代（1：3 或 1：4）。

(5) 写上细胞名称、代数、时间、放入 CO<sub>2</sub> 培养箱中，37 °C 培养。

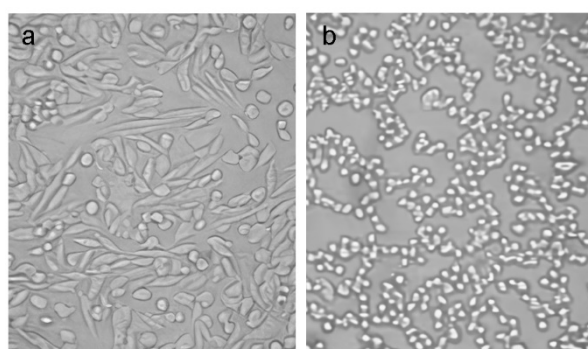


图 1 HeLa 细胞传代培养过程中细胞形态。a 准备用于传代的细胞；b 加入胰酶约 3 min 后；c 分散良好传到新皿中的细胞。

## 2. HeLa 细胞冻存

细胞冷冻保存就是将体外培养细胞悬浮在加有冷冻保护剂的培养基中，以一定的冷冻速率降至零下某一温度，并在此温度下对其长期保存。在低于 -70 °C 的超低温下，有机体细胞内部的生化反应极其缓慢，甚至终止。从而可使生命活动固定在某一阶段而不衰老死亡。但在冻存的过程中，细胞内的水分很容易形成冰晶，损害细胞膜或细胞器而造成细胞的死亡。通过在培养液中添加冷冻保护剂可以缓解这种冷冻冰晶伤害。冷冻保护剂具有亲水性，易穿过细胞膜，对细胞毒性较小，可以使冰点降低，在缓慢分级降温冻存的过程中，也可使细胞内水分在冻结前部分透出胞外，避免冷冻时对细胞的损伤。



现广泛使用甘油和二甲亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)作保护剂,在冷冻保护剂存在的条件下,培养细胞可长期保存于液氮(-196℃)中。冻存细胞的具体操作如下:

(1) 冻存液配制: 培养液加 5-15%DMSO 保护剂。

(2) 消化细胞(方法同细胞传代)制成细胞悬液,以 800-1000 r/min 离心 5 min,弃上清液,加入冻存培养液,轻轻吹吸均匀,使细胞密度达  $1 \times 10^6/\text{ml}$ 。

(3) 按每管 1 ml 的量,分装入冻存管,拧紧管盖。

(4) 在冻存管上做标记,包括细胞系名字、冻存人及冻存日期,其他信息如细胞传代数等也可一并写在管壁上。

(5) 分级冷冻: 4℃冰箱 30 min,转入-20℃冰箱内 30-60 min,放入-70℃冰箱过夜。 -70℃冰箱可短期保存细胞,将冻存管放入液氮罐中可长期保存。

注意事项: 1. 由于 DMSO 在室温状态下易损伤细胞,因此当在细胞中加入含有 DMSO 的冻存液后,要尽快放入 4℃的环境中; 2. 细胞密度对冻存和复苏过程中的细胞存活率有影响,细胞密度过低时存活的细胞较少,通常将细胞浓度调到  $10^6/\text{ml}$  左右为宜; 3. 液氮为-196℃,操作时最好戴厚棉手套,以免皮肤接触液氮而冻伤。

### 3、HeLa 细胞复苏

冷冻保存培养细胞时,必须加入保护剂。在冻存过程中由于细胞新陈代谢趋于停止,DMSO 不能发挥其细胞毒作用。但是在室温,尤其是在细胞培养过程中,DMSO 却有很强的细胞毒作用。为尽量减少 DMSO 对细胞活性的影响,细胞从液氮中取出后应置于 37℃水浴中快速融化。快速融化也可以使细胞尽快度过 0℃这个最危险的阶段,避免细胞内的小冰晶形成大的冰晶从而对细胞造成二次伤害。将全部融化后的冻存液转入离心管中进行离心,去含有 DMSO 冻存液,并将细胞沉淀转入新的培养皿中,加入 37℃预热的培养基以保证细胞尽快恢复活性与生长增殖。复苏细胞时迅速融化是为了使细胞快速通过最易受损的温度,从而达到保护细胞活力的作用。细胞冻存和复苏要记住“慢冻速融”的原则。细胞复苏的具体操作如下:

(1) 准备工作: 将恒温水浴箱中的水调至 37℃; 将放在 4℃冰箱储存的细胞培养液取出,经带有消毒水的纱布擦拭后将培养液置于水浴箱中进行预热,随后将培养液瓶口经灼烧后将盖拧松放进洁净台待用,注意要避免瓶口开盖时间过长而引起培养液的 pH 改变。

(2) 解冻复苏: 从液氮罐或-80℃冰箱中迅速取出冻存管,用大镊子夹其盖部,在 37℃温水中快速摇动。待融化后,快速用含有消毒水的纱布擦拭,放入洁净台;冻存管口迅速过火开盖,将其底部的细胞轻轻吹打起来,转移至离心管中并向离心管中加入 10 倍冻存液体积的培养液,混匀 800-1000 rpm 离心 3 min; 离心管管口过火,拧开盖后再过火,将液体倒进废液缸,管口再次过火,加入适度新鲜培养液,轻轻吹打离心管底部的细胞使其悬浮,随后将其转移至培养皿中。

(3) 观察细胞的状况，在放入 CO<sub>2</sub> 培养箱前，需观察细胞细胞膜是否完整及细胞是否饱满，健康的细胞立体感强，边缘整齐，细胞内颗粒少，非常透明，折光率高；凡细胞内颗粒较多，细胞边缘多破损，细胞不透明，立体感差，折光率弱的是不健康的细胞。

(4) 放入培养箱培养。第二天观察细胞生长情况，更换培养液。

注意：如果冻存管从液氮罐中，要首先观察一下冻存管中是否进入了液氮。如果进入液氮，千万不能直接将冻存管放入水浴锅，巨大的温差很可能会导致液氮急剧气化而使得冻存管炸掉。可以将冻存管盖拧松半圈，待液氮挥发干后再将冻存管置于水浴锅中。建议整个复苏过程中穿戴护目镜和厚棉手套。

#### 4. 细胞计数

日常培养细胞可通过显微镜观察判断生长密度，判断何时需要传代。但如要进行药物筛选等实验，需要多个平行起始标准化的培养，就需要对细胞进行计数。传统的细胞计数一般是通过细胞计数板完成。目前有细胞自动计数仪，可迅速读出细胞的密度数值及区分死活细胞，省去了人工计数和计算的过程，给实验提供便利。细胞计数板计数和细胞计数仪计数的基本原理类似，需掌握。

细胞计数板又称血球计数板或改良牛鲍氏型计数板(Neubauer improved cell counting chamber)，它是用优质厚玻璃制成，每块计数板由 H 形凹槽分为 2 个同样的计数池。计数池两侧各有一支持柱，将特制的专用盖玻片覆盖其上，形成高 0.10 mm 的计数池。计数池画有长、宽各 3.0 mm 的方格，分为 9 个大方格，每个大格面积为 1.0 mm × 1.0 mm = 1.0 mm<sup>2</sup>；容积为 1.0 mm<sup>2</sup> × 0.1 mm = 0.1 mm<sup>3</sup>，即 0.1 μl。计数室通常有两种规格：一种是 16×25 型，即大方格内分为 16 中格，每一中格又分为 25 小格；另一种是 25×16 型，即大方格内分为 25 中格，每一中格又分为 16 小格。但是不管计数室是哪一种构造，它们都有一个共同的特点，即每一大方格都是由 16×25=25×16=400 个小方格组成。细胞计数使用四角的四个大方格。

细胞个数 / mL = 4 个大方格细胞总数 / 4 × 10000 × 稀释倍数。

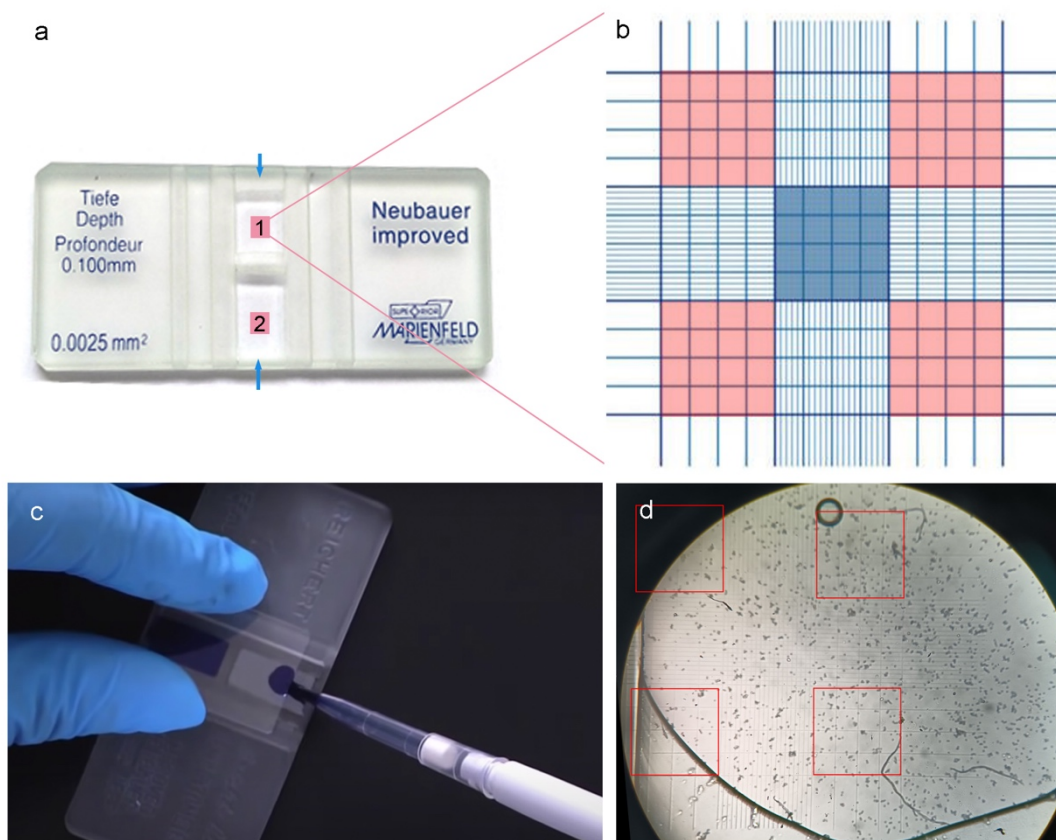


图2 细胞计数。a 16×25 型的计数板分格; b 细胞计数用红色示出的四个大方格; c 加样; d 计数板上分散的 HeLa 细胞及计数区。

细胞计数的具体操作如下：

(1) 用 95%酒精冲洗计数板后，用干净镜头纸擦净；另擦净盖片一张，把盖片覆在计数板上，使之微微移向一侧，露出计数板台面少许，以便滴加细胞悬液。

(2) 把计数板平放在显微镜台上，反复吹打细胞悬液是细胞重悬均匀后，立即从计数板边缘轻轻滴 1~2 滴细胞悬液，使之充满计数板和盖片间空隙中。滴细胞悬液要干净利落，勿令液面盖过盖片，加量要适当，过多易使盖片漂移，过少易出现气泡，不理想时应重做。

(3) 镜下观察可见细胞分散各处，用 16×25 型的计数板，分别数出计数板四角四个大方格的细胞数，压中线者只计算左线和上线者，右线和下线不计算在内；偶见有两个以上组成的细胞团，应按单个细胞数计算，如细胞团数占 10% 以上，说明消化不充分或细胞数少于 20 个 /  $\text{mm}^2$  或多于 50 个 /  $\text{mm}^2$  时均说明稀释不当，需要新制备细胞悬液，再重新计数。

## 【实验结果】

在进行细胞培养的各步骤需注意观察细胞的形态。首先观察培养基颜色，是否清亮。然后在倒置显微镜下观察细胞状态，是否污染等。

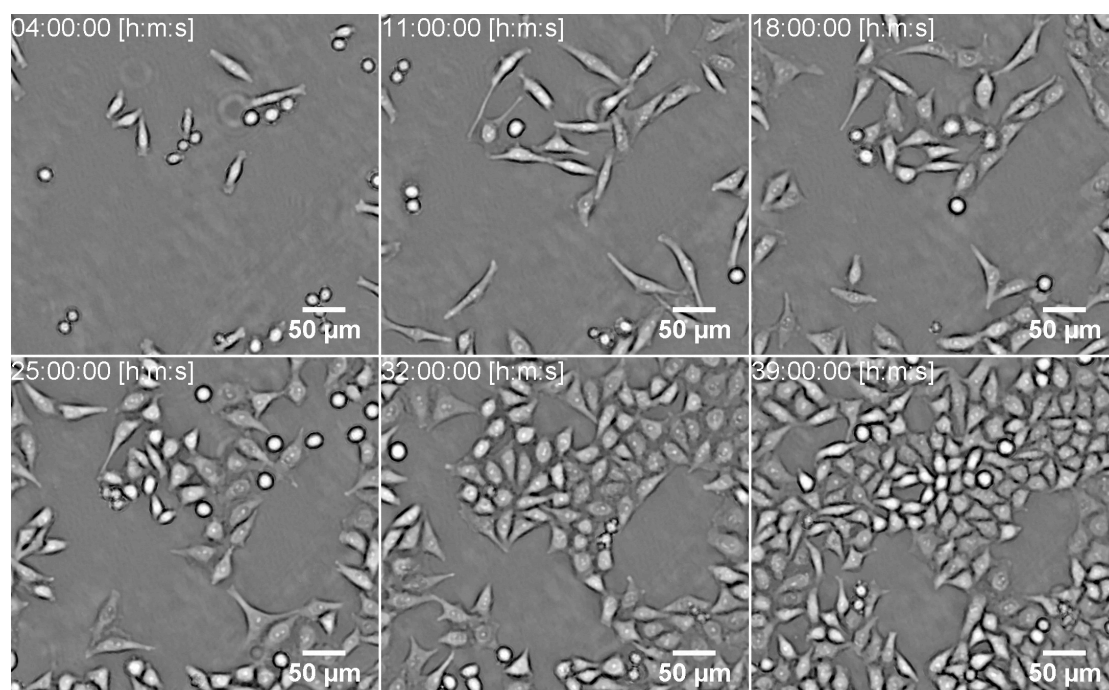


图 3 HeLa 细胞传代培养过程中形态观察。

## 【注意事项】

- (1) 严格的无菌操作的意识。
- (2) 酶消化的时间要合适，注意要确保酶液覆过所有的细胞，尤其注意皿中间的细胞。酶解不充分细胞不易分散开，酶解过度也会造成细胞粘在一起成团。

## 【思考讨论】

1. 阅读“灭菌、除菌和消毒方法简介”，思考自己在实验操作中需要做哪些？哪些是已经完成。

灭菌、除菌和消毒方法简介：

(1) 紫外线消毒：紫外线是一种低能量的电磁辐射，可以杀灭多种微生物；革兰阴性菌最为敏感；其次为革兰阳性菌；再次为芽孢。紫外线直接作用通过破坏微生物的核酸及蛋白质等而使其灭活；间接作用通过紫外线照射产生的臭氧杀死微生物。消毒后空



间内的残留臭氧只需 30~40 min 即能自行还原成氧气。培养室(空气、地面、工作台表面及塑料培养皿等)消毒, 目前多使用紫外灯直接照射。灯管离地面的距离应在 2.5 m, 达到  $0.06 \mu\text{W}/\text{cm}^2$  能量的照射, 发生有效的消毒作用。由于各种细菌对紫外线的敏感性不同, 所用照射时间和剂量也不同。如紫外线照射 20、40、60 min 后, 空气中细菌分别下降 71%, 79%, 86%。紫外线照射工作台面的距离不应超过 1.5 m, 照射时间 30 min 左右。紫外灯照射还受其它环境条件(如室温和湿度、空气清洁度、遮盖物、染菌量、紫外灯管的老化程度等)影响。

注意:紫外线不仅对皮肤、眼睛有伤害, 而且对培养细胞与试剂等也可产生不良影响。因此, 不能开着紫外灯工作。

(2) 压力蒸汽灭菌: 压力蒸汽灭菌是目前最常用的一种灭菌方法。其通过高温高压及在蒸汽环境中存在的潜热作用和良好的穿透力, 使菌体蛋白质凝固变性而使微生物死亡。布类衣物、玻璃器皿、金属器械、胶塞和某些培养用液(不包括酶、抗生素、血清、维生素及有生物活性的蛋白质等)都可应用这一方法。实验器材(非溶液类)一般采用 0.14 MPa、121-126°C、15 min。溶液类一般采用 0.1 MPa、115°C、10 min。

在使用压力蒸汽灭菌的过程中, 应该注意: 螺口瓶高压灭菌时须将螺帽稍微拧松, 塞橡胶塞瓶高压时须将在瓶塞上插入一个 5 或 7 号针头, 以便在加热时使瓶内的空气能自然泄出, 平衡瓶内外的气压。当液体灭菌达到时间后, 切勿立即将灭菌器内打开。否则, 由于液体的温度未能迅速下降, 而压力蒸汽突然释放, 会使液体剧烈沸腾, 造成溢出或容器爆裂等危险事故。应该待压力表指针回复至零位, 稍等几分钟后将盖打开。

(3) 电离辐射灭菌: 是以放射性核素产生的  $\gamma$  射线或电子加速器产生的加速粒子辐照物品以杀灭细菌等微生物的方法。 $\gamma$  射线由放射性核素  $^{60}\text{Co}$  产生, 加速粒子由电子加速器产生。两者均可对金属、塑料橡胶、玻璃陶瓷、人工医学制品等进行灭菌。电离辐射灭菌优点: 辐射灭菌不使物品升温, 对于不耐热物品的灭菌尤其适用; 辐射的穿透力强, 经密闭包装的物品进行灭菌后, 可长期保存, 随取随用。一次性塑料器械与物品, 如培养瓶皿、培养板、注射器、移液器吸头、离心管等, 都可以经电离辐射灭菌。

(4) 过滤除菌(正压过滤): 具有生物活性的液体, 如人工合成培养液、血清、酶溶液等, 在高温下会发生蛋白变性, 失去其功能, 因此必须采用滤过法除菌。常用滤器有 Zeiss 滤器、微孔滤膜滤器及各种不同规格的一次性滤器。现用滤膜是由混合纤维素制成微孔滤膜。组织培养常用孔径  $0.22 \mu\text{m}$  孔径滤膜过滤除菌。 $0.1 \mu\text{m}$  孔径滤膜可去除支原体。

(5) 化学方法消毒: 化学消毒剂包括新洁尔灭、过氧乙酸、84 消毒液和 75% 酒精等。此类消毒剂主要用于消毒那些无法用其他方法进行消毒的物品, 如操作者的皮肤、操作台表面及无菌室的桌椅、墙壁和空气等。

0.1% 的新洁尔灭: 它是目前组织培养实验室常用的消毒剂, 器械、皮肤和操作台表

面，都可用它浸泡和擦拭消毒。

**75%酒精：**它是一种广泛应用的消毒剂，消毒效果可靠。由于乙醇的挥发性好，常用于需要快速发挥作用而不必持续时间太久的消毒，如操作者与实验对象的皮肤消毒，台面或物体的表面消毒。由于乙醇不能杀死芽孢，一般的取材器械等物品不宜用乙醇浸泡消毒。此外，橡胶和塑料制品长接触乙醇会使其变硬。

**过氧乙酸及 84 消毒液**消毒能力极强，在浓度为 0.5% 时，10 min 即可将芽孢菌杀灭，可用作各种物品的表面消毒，使用时需用水稀释后，用喷洒和擦拭方法消毒。

**注意：**接触过对人体有害的细菌、病毒等的物品，用完后则需立即浸入此类消毒液中。

**(6) 火焰消毒：**在洁净台中工作时，可用酒精灯火焰消毒培养用具。此法仅限于在培养操作时消毒瓶口、吸管、剪刀、镊子等器械的快速消毒。**注意：**塑料物品切勿过火；金属物品，勿在火焰中停留过长，以防退火，而且要等待冷却后，才可接触活组织。

**(7) 煮沸消毒：**至少要煮 30 min，不能杀死细菌的芽孢。除应急外，一般不用这种消毒方法。