

凍結保存と再構成

培養細胞の凍結保存と再構成の基本操作

注記：Clonetics™とPoietics™のヒト初代細胞と動物細胞には適しません。

凍結保存

1. コンフルエントまたはそれに近い状態のフラスコの細胞を選択します。
2. まずトリプシン処理で細胞を剥離させます。
3. 20%ウシ胎仔血清（カタログNo.14-501）含有のEMEM（カタログNo.12-136）で細胞濃度を 2×10^6 および 8×10^6 細胞/mlに調整します。遠心分離が必要になる場合もあります。
4. 上記の細胞懸濁液を等量の低温（+4℃）凍結保護培地（カタログNo.12-132A）に追加します。
5. 均質化されるように継続的に混合します。
6. 凍結保護培地で懸濁した細胞4 mlを5 mlのガラス製アンプルに移すか、液体窒素の液相または気相状態で凍結するのに適したプラスチック製ねじキャップ付きバイアルに1 mlを移します。
7. 細胞の凍結サイクルを開始できます。凍結前は、凍結保護培地中に1時間以上細胞を置かないでください。
8. その後、アンプル内容物の温度を1分当たり $0.5^\circ\text{C} \sim 2^\circ\text{C}$ の速度で $+4 \sim -30^\circ\text{C}$ の範囲まで下げる必要があります。
9. 温度は -30°C に到達後、 -70°C （細胞を保存可能な最高温度）まで急速に下げる場合があります。自動プログラム式凍結システムは凍結速度の調整を行える最も信頼性の高い手段です。
10. アンプルまたはバイアルの保管は -70°C 以下で行う必要があります。 -196°C （液体窒素）の保管温度が理想的です。再構成を行うまで、アンプル内容物の温度は常に -70°C に保つことが重要です。長期間または無期限の保存には液体窒素の使用が特に推奨されます。ドライアイスまたは冷凍庫（ -70°C ）での保管期間は3ヶ月未満にしてください。

アンプル取り扱いに関する推奨項目

アンプルの受け取り

受け取ったら直ぐにアンプルを配送容器から -70°C フリーザーまたは気相段階にある液体窒素に移します。長期間の保存（3ヶ月以上）には、生細胞率の著しい低下を防ぐために、気相での窒素タンクの使用が望ましいでしょう。ねじキャップ付きアンプルを液体窒素に浸すことは推奨されません。

使用方法

▲ 注意：保護マスクと保護服を着用してください。アンプルが破裂する恐れがあります。

1. アンプルをフリーザーから取り出し、 37°C の水槽に入れます。アンプルを水中に沈めたり、水面がキャップより下にならないようにしてください。
2. 解凍後、70%イソプロパノールでアンプルを滅菌してから、クリーンベンチ内で滅菌状態で開封します。適切な増殖培地を用いて1:10の比率で希釈してください。
3. トリバンブル除去細胞カウント法で解凍された生細胞率と細胞濃度を測定します。
4. 播種培養容器に合わせて細胞濃度を調整します。
5. 細胞の播種後24時間経ったら培地を取り除き、適切な増殖培地を追加して再度培養します。6を実行しない場合は、この時に凍結保存剤を取り除きます。
6. 代替手段として、遠心分離による生細胞率の測定前に凍結保存剤を取り除いてもかまいません。低速で10分間、再懸濁された細胞を遠心分離（ $200 \times g$ ）によって取り除きます。上清は除去され、細胞は適切な増殖培地で再懸濁されます。

参考文献

Freshney, R.I. (2000) *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique, 4th edition*, Wiley-Liss, Inc., New York, pp. 297 – 308.