

## <細胞凍結保存液バンバンカー 凍結保存から解凍操作までの手順>

### (凍結保存操作)

保存する細胞が対数増殖期に達したら、培養中の培養容器をインキュベーターから静かに取り出す。

\* 凍結保存時に対数増殖期にあることが、良好な生存率を確保する上で最も重要なポイントとなります。

その一部をトリパンブルーにて染色して細胞数をカウントする。

培養液を遠心管に移して所定の条件にて遠心分離する。

上清を取り除き、ペレットをボルテックスで懸濁する。

細胞数が凍結保存容器 1 本あたり所定濃度になるように凍結保存液を加える。

(凍結保存液 1mL あたり細胞数  $5 \times 10^5 \sim 1 \times 10^7$  個)

\* 以降の操作は出来るだけ迅速に実施します。また、凍結保存液を冷蔵庫から出したら、なるべく早く保存処理を実施します。

細胞懸濁液を予備凍結せずにそのまま -80 で保存する。

\* このとき、凍結処理容器バイセル (Funakoshi) 内にて保存すると、より効果的な場合があります。

液体窒素保存の場合は、-80 で 12 時間程度 (オーバーナイト) 保存し、状態が安定した後で液体窒素へ移す。

\* 細胞を移す操作は出来るだけ迅速に実施します。

### (解凍操作)

37 のドライバス (またはウォーターバス) などで凍結細胞を融解し、細胞液が完全に融解していることを確認する。

\* この操作は迅速に行います。細胞が凍結状態から解凍された状態に移行する際に、ダメージを受けやすい温度域があります。その温度域を素早く通過させる必要があります。

細胞液を 10mL 程度の洗浄液 (培養液) の中に注入し、十分混和した後に所定条件で遠心分離 (例:  $300 \sim 400 \times g$ ; 半径 21cm ローターで 1200rpm) する。

上清を取り除き、ペレットをボルテックスで懸濁する。

培養液を加えて十分混和した後に、その一部をトリパンブルーにて染色して細胞数をカウントする。

培養液を培養容器へ移し、インキュベーターへ静置して培養する

以上