

Protocol to cryopreserve cell cultures (英語原文は[こちら](#)からご確認いただけます。)

「細胞株の凍結保存方法」

細胞株の凍結保存プロトコルを教えてください。

一般的な細胞株の凍結保存方法は下記の通りですが、必要に応じて変更して下さい。ATCC 細胞株の凍結保存用培地はプロダクト・インフォメーション・シートに記載されています。常に対数増殖期の細胞を回収するようにして下さい。

1. 凍結保存前に、バクテリア、真菌、マイコプラズマ、ウィルス等に培養細胞がコンタミしていないかどうか、ただちに確認を行って下さい。ほとんどの場合、コンタミネーションのスクリーニングの結果は凍結保存後しばらくして（10日から14日）得られます。もしコンタミネーションが判明した場合には、その凍結保存アンプルは廃棄して下さい。
2. 培養用の完全培地と5%DMSOからなる凍結保存用培地を調整します。水溶液の中のDMSOの溶解は、熱（発熱）を放つことから、DMSO原液を細胞懸濁液に直接添加しないで下さい。
3. 細胞に影響のない程度（10分125G）で遠心回収し、 1×10^6 ～ 5×10^6 個/mlになるように凍結保存用培地に再懸濁します。凍結保存状態から起眠させた細胞の生存を確認するまで、細胞の培養を続けて下さい（下記9番もご参照下さい）。
4. 細胞株の名前、日付と共に適切なバイアル番号をラベルします。そしてラベルしたバイアルに（バイアルの容量にもよりますが）1～1.8mLの細胞懸濁液を加え密封してください。
5. 細胞と凍結保存培地を平衡化させるため、最低15分から60分以内の範囲で室温静置してください。通常細胞懸濁液を分注することにより、この時間が経過することになるでしょう。60分以降になると、DMSOの影響により細胞の生存率が低くなるかもしれません。
6. 温度調節できる凍結容器内に細胞懸濁液の入ったバイアルを入れ、この容器ごと -70°C 以下に設定された冷凍庫に少なくとも24時間置いて下さい。もしくは、 -70°C まで毎分 1°C ずつ徐々に低下するように設定可能な凍結プログラム機能を有する機器を使って細胞懸濁液の入ったバイアルを凍結して下さい。



7. -70°C まで徐々に凍結させたバイアルは、液体窒素の気相中、もしくは -130°C の超低温冷凍庫に素早く移して下さい。凍結バイアルは毎分 10°C の速さで温度が上昇し、 -50°C 以上になると細胞は急激にダメージをうけてしまいます。
8. 保存したアンプルの場所などを控えておいて下さい。
9. -130°C で 24 時間凍結保存後、凍結バイアルを 1 つ取り出して起眠させます。そして、生存率やコロンタミなどを確認して下さい。

