

凍結細胞の調製、融解、送付について

1. ご用意いただく試薬・消耗品

- ・ CryoStor CS10 (Sigma-Aldrich; C2874-100ML)
<https://www.sigmaaldrich.com/JP/ja/product/sigma/c2874>
- ・ CoolCell LX (ビーエム機器; BCS-405G)
<https://www.bmbio.com/shop/g/gBCS-405G/>
- ・ CoolCell Filler Vial (ビーエム機器; BCS-3105)
<https://www.bmbio.com/shop/g/gBCS-3105/>
- ・ クライオチューブ
※ チューブには内容物がわかる様にラベルをしてください
- ・ フタ付き発泡スチロール容器 (容量 5 L 程度、検体送付用)
- ・ ドライアイス (2~3 kg、検体送付用)

2. 実験を始める前に

- 1) CoolCell LX ならびに CoolCell Filler Vial を冷蔵庫で 4°C に保冷する

3. 細胞の凍結保存

※ **1 チューブあたり細胞 1×10^5 個以上、1 検体あたり 3 チューブ送付できる様に調製をお願いいたします**

- 1) 単一細胞懸濁液を調製する
- 2) 細胞懸濁液を遠心 (300 x g, 4°C, 5 min)
- 3) 上清除去、ペレットをタッピングでほぐす
- 4) CryoStor CS10 を添加し、ピペッティング
- 5) クライオチューブに 1 mL/tube 移して on ice
- 6) Pre-freeze (4°C, 10 min)
- 7) 冷蔵庫で保冷しておいた CoolCell LX に移動
- 8) CoolCell LX の空ウェルにはダミーのチューブ (CoolCell Filler Vial) を入れる
- 9) -80°C に移す
- 10) 15-20 分後に CoolCell LX をタップして ice nucleation を開始
- 11) (長期保存の場合) 4 時間以上経過したら、液体窒素に移す

4. 細胞の融解

※ **融解後に、細胞生存率が 80% 以上であること、細胞同士が凝集しないことをご確認ください**

- 1) 準備する試薬など
 - ・ 10% FBS 含有 RPMI 培地: 室温 (25°C) と 37°C の二種類
 - ・ 37°C のウォーターバス
- 2) 8 mL の培地が入った 15 mL チューブを 37°C に保温
- 3) 液体窒素、または -80°C からクライオチューブを取り出す
 - ・ 一度の融解に最大 2 本まで
- 4) 37°C のウォーターバスでよく振盪しながら、氷がわずかに残る程度まで融解
 - ・ 約 2 分程度かかる

- 5) ピペッティングせず、ブルーチップで2)のチューブに移す
- 6) クライオチューブに 1 mL の培地を添加し、ピペッティングせず、ブルーチップで同じ 15-mL チューブに移し (合計 10 mL)、軽く混和
- 7) 遠心 (300 × g, 5 min, RT)
- 8) 上清除去、ペレットをタッピングでほぐす
- 9) 37°C の培地を 0.1 mL 添加し、5 回ピペッティング
- 10) 氷上に静置
- 11) 細胞懸濁液の細胞計数を行うとともに、血球計算盤などを用いて細胞が凝集していないことを確認してください。

5. 細胞の送付

- 1) 凍結検体の準備が整いましたら、本拠点担当者に連絡をとり、必ず送付日程を調整してください。
- 2) 内容量が 5L 程度のフタ付き発泡スチロール容器とドライアイスを 2~3 kg をご用意ください。
- 3) クライオチューブをキムワイプなどに包み、適切な大きさのプラスチック容器などに入れてください。
・容器内で内容物が大きく動かない様にしてください。
- 4) クライオチューブを入れた容器を発泡スチロール容器に入れ、その上から砕いたドライアイスを十分量入れてください。
- 5) 輸送中に発泡スチロール容器のフタが開かない様にテープで十分に止めてください。
- 6) 発送には、宅配業者のクール冷凍便をご利用ください。
- 7) 月曜日から金曜日までの午前 10 時から午後 5 時の間に到着する様に、発払いで発送をお願いいたします。
- 8) 発送先

〒236-0004 横浜市金沢区福浦 3-9
横浜市立大学 基礎研究棟 B503 室
医学部免疫学教室
電話：045-787-2614
西山 晃 宛

- 9) 発送後、ご利用の宅配業者のお名前と追跡番号を下記のメールアドレスまでご連絡ください。

m_riyou@yokohama-cu.ac.jp

- 10) 受け取り後に、確認のメールをお送りいたします。