

iPS細胞凍結法

Objective	ヒト ES/iPS 細胞を緩慢方法で凍結する方法.
Materials	ReproCryo RM(RCHEFM004) ESGRO complete ACCUTASETM 15 mL チューブ 恒温槽 インキュベーター 5mL & 10mL ピペット 1000 μ L ピペットマン& チップ スチロールBox 手袋、軍手 遠心機 アスピレーター
Methods	<p>注1:以下の試薬用量は60 mm ディッシュの場合</p> <p>注2:各培地で培養したヒト ES/iPS 細胞を継代するタイミングの細胞量で凍結</p> <p>注3:細胞懸濁液に対して等量の ReproCryo を、15 mL チューブをゆらして混合しながら、10 秒かけてゆっくり入れる</p> <p>注4:ReproCryo を添加後に 37°Cの恒温槽で 30 分間インキュベーション</p> <p>注5:凍結時にはBICELLを用いて-80°Cまで凍結してから液体窒素に入れ替える</p> <p>注6:凍結保存容器で凍結開始後、3時間から6時間以内に液体窒素へ凍結バイアルを入れる</p> <ol style="list-style-type: none">1. ReproCryo を冷蔵庫に一晩おいて解凍 *解凍後は分注して-20°Cで保存2. フィーダーフリー培養ヒト ES/iPS 細胞の上清を除去3. PBS (-) 2 mL で細胞を洗う4. PBS (-)を除去して、ESGRO complete ACCUTASETM 1 mL を加える5. 37°C、5% CO₂ インキュベーターに 10 分おく6. ディッシュを取り出して、培養時の培地を 1 mL 加える(sum = 2 mL)7. P-1000 ピペットで細胞を剥がし、細胞懸濁液を 15 mL チューブへ移す

*細胞はシングルセルの状態

8. 300×g、5 分間、室温で遠心

9. 上清を除去

10. 培養時の培地を 0.5 mL 加えて細胞を懸濁

11. 細胞懸濁液に 0.5 mL の ReproCryo を10秒かけてゆっくり加える

*15 mL チューブをゆらして混合しながら加える (sum = 1mL)

12. 37°Cの恒温槽で 30分間インキュベーション

13. 10 分毎に一時的に取り出して、P-1000 ピペットで 2 回ピペッティング
そこに溜まっている細胞を均一にする

14. 30 分後、細胞懸濁液を 15 mL チューブからクライオチューブに移す

15. 予め 4°Cに冷やしておいたBICELLに移して-80°C 冷凍庫へ

16. 3時間から6時間いれて凍結