

# iPS細胞凍結法

Objective	ヒト ES/iPS 細胞を急速冷凍する方法.
Materials	RCHEFM001 Freezing medium RCHETP002 Dissociation solution PBS(-) 15 mL チューブ 恒温槽 インキュベーター 5mL & 10mL ピペット 1000 $\mu$ L ピペッTMン& チップ スチロールBox 手袋、軍手 遠心機 アスピレーター 液体窒素 氷 ピンセット チューブ立て
Methods	<ol style="list-style-type: none"><li>凍結チューブに必要事項（細胞名、継代数、日付、ディッシュサイズ等）を記入、氷上で冷やす</li><li>液体窒素をクリーンベンチの中に置く</li><li>15ml遠心チューブ、凍結チューブたて、ピンセット、p-1000ピペッTMンおよび滅菌済みチップを使いやすい所に配置</li><li>P-1000ピペッTMンをあらかじめ200<math>\mu</math>Lにセット</li><li>コンフルエント状態のヒトES/iPS細胞を準備</li><li>Mediumを除き、PBS(-) 2~3 mLで細胞を洗う</li><li>剥離液をディッシュに1 mL加え、細胞表面全体に液が行き渡るようにする</li><li>37°C、CO<sub>2</sub>インキュベーターで5分程加温</li><li>Mediumを2~3 mL加え、コロニーを塊のまま剥がし、15 mL遠心チューブに移す</li><li>170<math>\times</math>g (1,000 rpm)、4°C、5分間遠心</li></ol>

11. 上清を除く

12. 氷冷

注1)以下の操作は、1サンプルずつ行う

13. あらかじめ氷冷しておいた凍結チューブ1本をクリーンベンチ内に用意

14. p-1000 ピペットマンで保存液を200 $\mu$ Lとる

15. 保存液を12のチューブに加え、細胞を懸濁後、凍結チューブへ移す

16. すぐに蓋を閉めてピンセットで凍結チューブを保持

17. チューブの底部から2/3までを液体窒素にひたす

\*この操作は15秒以内を目安に作業を完了

18. 液体窒素中で十分に冷却し、液体窒素タンクに移す