

凍結保存液 ラボバンカー

		容量 x 本数	Code No.
血清タイプ	ラボバンカー 1	100 ml x 1 本	BLB-1
		20 ml x 4 本	BLB-1S
無血清タイプ	ラボバンカー 2	100 ml x 1 本	BLB-2
		20 ml x 4 本	BLB-2S

1 製品概要

培養細胞の凍結保存は、細胞株の保存のため必要不可欠の操作です。現在、細胞を懸濁してそのままディープフリーザーで凍結できる凍結保存液が一般的に使用されるようになりましたが、細胞によっては解凍後に増殖せずに徐々に死んでしまうことがありました。「ラボバンカー」では現在行われている幅広い研究に対応できるように成分の配合を検討し、DMSOの濃度を10%で維持しつつも凍結保護性能を高め設定いたしました。それにより凍結に弱い細胞でも安心してディープフリーザーで凍結保存できるようになりました。

さらに「ラボバンカー」では大腸菌の凍結保存やバキュロウイルスのハイタイターストックの保存もできるようになりましたので、「ラボバンカー」だけで研究室のさまざまな生物資源を凍結保存できるようになりました。

2 製品貯蔵方法

ご使用前のラボバンカーは、通常 4℃以下で保管して下さい。長期間保管する場合は凍結して保管して下さい。凍結と融解を繰り返すと性能が低下する恐れがありますので、一度融解したものは使用量に合わせて分割し凍結保存するか、4℃で保管することをお薦めいたします。

3 品質

- 1 無菌試験 細菌、真菌およびマイコプラズマ混入なし
- 2 使用血清（ラボバンカー 1） 輸入証明書発行済み
- 3 化学試験
 - 1) 水素イオン濃度 pH 7.0 ~ 8.5（室温）
 - 2) エンドトキシン 20EU/ml 以下
- 4 性能試験
解凍時生存率 80% 以上（Jurkat 細胞、CHO 細胞）

4 保証

製造日より 3 年

5 使用上の注意

- 1 本製品は研究用以外の目的で使用しないでください。
- 2 治療を目的とした細胞の保存には使用できません。
- 3 人体には使用できません。
- 4 ご使用に際しては、目的の細胞で事前に試用試験を実施してください。

6 使用方法

6.1 培養細胞の凍結・解凍

培養細胞の凍結プロトコール（接着細胞は（1）から、浮遊細胞（4）からはじめてください。）

- (1) 培養シャーレ内の培地を取り除き、PBS で洗う。
- (2) PBS を取り除いた後、Trypsin・EDTA-PBS を入れて室温で 5 分くらい放置する。^{注1)}
- (3) 新しい培地を加えて pipetting をして細胞をシャーレから剥がす。
- (4) 浮遊した細胞を遠心チューブに移し、細胞数を数える。
- (5) 遠心分離し（200～300 g、5 分）、上清を捨てる。
- (6) ラボバンカーを加え細胞を浮遊させる（ $5 \times 10^5 \sim 5 \times 10^6$ cells/ml の割合で液量を決める）。^{注2)}
- (7) クライオチューブに（6）の細胞浮遊液を 0.5ml～1.0ml ずつ分注する。
- (8) 氷上に 10 分間静置する。
- (9) -80°C （ディープフリーザー）で凍結させる。^{注3, 4)}
- (10) 長期保存の場合、24 時間後に -196°C （液体窒素）内で保存する。

注 1) 接着細胞をシャーレから剥がす際に細胞に傷が付きますと、細胞が凍結に耐えられないため解凍後に生存率が低下します。

注 2) 細胞の濃度は、おおよその目安としてください。適切な細胞の濃度は、解凍後に播種する細胞数（表 1）を考慮して、決めてください。濃度が範囲内に収まらない場合でも解凍後の生存率はほとんど変わりません。

注 3) クライオチューブを箱などに入れて凍結する場合は、冷気が直接クライオチューブに触れるように、一晚、箱などのふたを閉めないほうが解凍後の生存率が上昇します。

注 4) 2 年ぐらいの凍結保存であればディープフリーザー内でそのまま保存できます。ただしディープフリーザーの開け閉めが激しい場合は生存率が落ちることがあります。

表 1 シャーレと細胞の濃度

	培地量	細胞数
6well プレート	2 ml	$2 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$ cells
10cm シャーレ	10 ml	$1 \times 10^6 \sim 5 \times 10^6$ cells
15cm シャーレ	20 ml	$2 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$ cells

培養細胞の解凍プロトコール

- (1) 細胞を解凍する機器（ウォーターバスを細胞の培養温度にセットし、遠心機は室温にセットする。
- (2) 凍結していた細胞懸濁液の 10 倍量の培地を遠心チューブに小分けして、培養温度に設定したウォーターバス等で温める。また（6）で細胞を播種するために使用する培地も温める。^{注5)}
- (3) 凍結していた細胞をウォーターバス等で迅速に温めて、すべてが融解する瞬間まで温める。^{注6, 7)}
- (4) 解凍した細胞を（2）で温めておいた培地に移して軽く転倒混和して、1～2 分間室温で静置する。
- (5) 室温で 1 回遠心をして上清を除く。
- (6) （2）で温めておいた培地を使って細胞をやさしく懸濁し、シャーレに移す。
- (7) シャーレを CO_2 インキュベータ等に移して、常法どおり培養する。

注 5) DMSO に感受性が高い細胞（HL60 細胞など）でも、洗浄に使用する培地はあらかじめ温めてご使用ください。冷えた培地で洗浄した場合と比べて、播種後の生存率が上昇します。

注 6) -80°C の冷凍庫で凍結していた細胞を解凍する場合に、解凍に要する時間は概ね表 2 のようになります。細胞が解凍された後も温め続けますと、播種後の生存率が徐々に悪くなります。

注 7) 1～2 本のクライオチューブを解凍する場合であれば、次の操作まで氷冷は必要ありません。ただし多量の細胞を解凍して次の操作まで時間がかかる場合は、解凍後に氷冷して（4）で混和後に 2 分間室温で静置してください。

表 2 解凍温度と解凍に要する時間

解凍温度 (= 培養温度)	凍結細胞 の体積	解凍時間	
		クライオチューブ底面 V 底	U 底
27°C (昆虫細胞)	0.5 ml	2 分 00 秒	～ 2 分 20 秒
	1.0 ml	2 分 15 秒	～ 2 分 30 秒
37°C (哺乳類細胞、大腸菌)	0.5 ml	1 分 40 秒	～ 2 分 00 秒
	1.0 ml	1 分 55 秒	～ 2 分 10 秒

6.2 大腸菌の凍結・解凍（無血清タイプ推奨）

大腸菌の凍結プロトコール

・1つの製品で培養細胞と大腸菌の保存に使用する場合は、ラボバンカーのコンタミネーションを防ぐために、はじめに大腸菌専用として小分けしたものをご使用ください。

- (1) 大腸菌を LB 培地等で OD600 = 0.6 ~ 1.0 になるまで培養する。^{注 8)}
- (2) 大腸菌を保存用チューブに適量移し、氷上で 5 分間冷やす。
- (3) (2) と等量のラボバンカーを加える。^{注 9)}
- (4) -80℃(ディープフリーザー) で凍結させる。

注 8) 液体培地に抗生物質が含まれていても、解凍後の生存率には影響しません。

注 9) ラボバンカーの最終濃度が 50% になるように加えてください

大腸菌の解凍プロトコール

1. 解凍後にプレートにストリークする場合

- (1) 大腸菌を解凍する機器（ウォーターバス等）を細胞の培養温度にセットする。
- (2) 凍結していた大腸菌を、ウォーターバス等で迅速に融解する。^{注 10)}
- (3) 解凍した大腸菌をプレートにストリークする。^{注 11)}

注 10) 解凍時間は表 2 を参考にしてください。

注 11) 使用するプレートに抗生物質が含まれていても、培養後の生存率には影響しません。

2. 解凍後に液体培地で増殖させる場合

・解凍した大腸菌を 100 倍量以上の培地で増殖させる場合は、解凍した大腸菌を培地にそのまま加えて増殖させてください。
・解凍した大腸菌を 100 倍量以下の培地で増殖させる場合は、以下のプロトコールで一度凍結保存液を除いてください。

- (1) 大腸菌を解凍する機器（ウォーターバス等）を細胞の培養温度にセットし、遠心機は室温にセットする。液体培地が冷えている場合は培養温度または室温まで温める。
- (2) 凍結していた大腸菌を、ウォーターバス等で迅速に融解する。^{注 12)}
- (3) 解凍した大腸菌を 10 倍量の液体培地に移し、5,000g で 5 分間遠心分離をする。
- (4) 上清を除き、液体培地で大腸菌を懸濁して培養を行う。

注 12) 解凍時間は表 2 を参考にしてください。

6.3 バキュロウイルスストックの凍結・解凍（無血清タイプのみ^{注 13)}）

バキュロウイルスストックの凍結プロトコール

・ラボバンカーでウイルスストックを 5 ~ 10 倍濃縮するプロトコールです。
・あらかじめ 20%(w/v)PEG (MW = 8,000) 水溶液を調製し、オートクレーブで滅菌してください。

- (1) (Option) 細胞の debris 等を除くために、1,000 g で 10 分間、遠心分離をする。
- (2) 上清を大きめの遠心チューブに移す。^{注 14)}
- (3) バキュロウイルスストックに等量の 20%PEG 水溶液を加える。
- (4) 氷上に 30 分間静置する。
- (5) 500g で 30 分間遠心分離をする。^{注 15)}
- (6) Pellet を崩さないように上清を大まかに除く。

注 13) 血清タイプは、血清にバキュロウイルスを凝集させてしまう成分が含まれていますので、解凍後にウイルスのタイターを大きく低下させてしまうことがあります。

注 14) (3) においてウイルスストックと等量の 20%PEG 水溶液を加えるため、バキュロウイルスストックの 2 倍量が入るチューブに移してください。

- (7) 500g で 1 分間遠心分離をする。
- (8) 上清を丁寧に除く。
- (9) はじめのウイルスストックの 1/5 ~ 1/10 量のラボバンカーを加えて、Pellet にラボバンカーが浸るようにして氷上に約 5 分間静置する。
- (10) やさしくピペティングをして pellet を懸濁する。
- (11) ウイルス懸濁液の量が多い場合は、1.0ml 以下に分注する。
- (12) -80°C(ディープフリーザー) で凍結させる。

注 15) 上清にわずかに白濁が残ります。

バキュロウイルスストックの解凍プロトコール

- ・解凍したウイルスストックは冷蔵で保存できません。
- ・解凍したウイルスストックを昆虫細胞に感染させる時は、100 倍量以上の培地で希釈されるようにしてください。

- (1) ウォーターバス等を 27°C にセットする。
- (2) 凍結していたバキュロウイルスを、ウォーターバス等で迅速に融解する。^{注 16)}
- (3) 昆虫細胞に解凍したウイルスを感染させる。

注 16) 解凍時間は表 2 を参考にしてください。

7 トラブルシューティング

Q1 解凍後の生存率が上がりません。プロトコールに書いてあること以外の原因として何か考えられますか。

A1 各操作で生存率を下げてしまう原因がありますので、確認をしてください。

- ① 対数増殖期を過ぎますと凍結に弱くなり解凍後の増殖も悪くなりますので、対数増殖期の細胞を凍結してください。
- ② 接着細胞をシャーレから剥がすときに細胞膜を傷つけてしまい、凍結に耐えられないことがあります。Trypsin 等で接着を十分に弱くしてからピペティングを行ってください。また一般的に浮遊細胞に分類されている細胞でも強い接着性がみられることがあります。Trypsin が使用可能であるか分からないときは、1-2 mM EDTA/PBS をご使用ください。
- ③ 最終的に液体窒素で凍結する予定であっても、少なくとも 1 日は -80°C で凍結を行ってください。直接、液体窒素で凍結しますと凍結スピードが早すぎるために生存率が低下します。
- ④ 解凍した細胞は低温に弱い傾向があります。使用する培地はあらかじめ培養温度に温めておいてください。
- ⑤ 細胞の解凍に要する時間が短いほど、生存率は上がる傾向があります。解凍時間を短くするために、凍結する細胞懸濁液の体積は 1ml 以下にすることを推奨しています。

Q2 凍結する細胞密度が $5 \times 10^5 \sim 5 \times 10^6$ cells /ml より小さく（大きく）なってしまっても大丈夫ですか。

A2 大丈夫です。本説明書に記載してある細胞密度はおおよその目安として参考にしてください。各シャーレに播種する細胞数は表 1 を参考にしてください。凍結時の細胞密度が非常に小さい場合、解凍後にシャーレに播種した時の細胞密度が小さいために、細胞の増殖が遅くなる場合があります。また凍結時に細胞密度が非常に大きい場合、凍結保存液への懸濁が不十分になったり、過剰なピペティングにより細胞を傷つけてしまうことがあります。

Q3 これまで凍結保存できた細胞等を教えてください。

A3 以下の細胞では 1 ヶ月間凍結して解凍した場合、90% 以上が生存し、増殖性に問題がないことを確認しています。

CEM	HOS
CHO	HUT78
COS7	Jurkat
E.coli (DH5 α 、BL21)	P3・NS-1/1・Ag4.1
HEK293 (血清培養、無血清培養)	Raji
Hela	Sf9 (血清培養、無血清培養)
HepG2	T cell hybridoma
HL60	WEHI-3

Q4 ラボバンカー1とラボバンカー2はどう使い分けたいですか。

A4 無血清培地で培養した細胞の中には血清に触れると増殖が抑制されることがありますので、血清を含む培地で培養した細胞を凍結保存するときには血清タイプのラボバンカー1を使用し、無血清培地で培養した細胞等を凍結保存するときには無血清タイプのラボバンカー2を使用するとよいと思います。またラボバンカー2は血清を含む培地で培養する細胞も凍結できますので、培地中の血清の有無を気にすることなく使用することができます。

Q5 大腸菌の凍結保存はラボバンカー1でもできますか。

A5 ラボバンカー1も大腸菌を凍結保存できる性能を持っています。しかしながらラボバンカー1は、もともと血清由来のタンパク質により自然に白濁する性質をもっているため、ラボバンカー1に大腸菌のコンタミネーションが起こっても分からなくなってしまう可能性があります。ラボバンカーのコンタミネーションを防ぐために、はじめに大腸菌専用として小分けしたものを御使用ください。

Q6 バキュロウイルスの凍結保存は血清タイプの保存液でもできますか。

A6 推奨していません。バキュロウイルスの感染に使用される昆虫細胞は、血清タイプの保存液で凍結させた場合に細胞が凝集を起こしてしまうことがあります。バキュロウイルスも同様の性質を持っているため、血清タイプの保存液で凍結したバキュロウイルスは、解凍した時にウイルスが凝集を起こしてしまうことがあります。

8 その他

8.1 MSDS

ご購入の方は弊社までお問い合わせください。

8.2 毒物・劇物

該当物はありません。

8.3 免責事項

(1) 使用期限を経過した製品の使用、または本取扱説明書に記載の取扱い方法以外の方法での製品の使用に起因するいかなる損害につきましても、弊社は一切の責任を負いません。

(2) 洪水、豪雪、豪雨、地すべり、地震、津波、突風、竜巻等の天災地変、火災、停電、労働紛争、原材料の入手手段の停止その他の不可抗力によって生じた製品に関連するいかなる損害につきましても、弊社は一切の責任を負いません。

(3) 製品に関連して生じた逸失利益を含む結果的損害、派生的損害、間接損害、特別損害および第三者からの請求に基づくいかなる損害につきましても、弊社は一切の責任を負いません。

(4) 購入された製品に関して弊社が責任を負う場合においても、弊社の責任はその製品の販売金額を超えないものとします。

—納期・注文・製品の内容に関するお問い合わせ—

総発売元

十慈フィールド株式会社

〒103-0001

東京都中央区日本橋小伝馬町 14-10 アソルティ小伝馬町 Liens ビル 4 階

TEL : 03-6264-9961

FAX : 03-6264-9962

E-mail : info@juji-field.co.jp

製造元

倉敷紡績株式会社 バイオメディカル部