

TC4-SOP 0-7 細胞冷凍

Myeloma Hybridoma 名稱: _____

MATERIALS:

- 冷凍保存液: **4 mL FBS + 3 mL DMEM + 1 mL DMSO 或 10% DMSO in FBS**
 - Fetal Bovine Serum (FBS) :
 - DOLBECCO'S MEM (DMEM) :
 - Dimethyl Sulfoxide (DMSO) :
- 冷凍小瓶
- 無菌塑膠滴管
- 50 mL tube
- 冰桶
- 離心機
- - 80°C 冰箱
- Laminar flow
- Piptmen P1000

METHODS:

- 確定 Flask T25 或 24 孔盤細胞生長旺盛，冷凍前一天依狀況減少為 1/2~1/3 細胞數目。
 - 換 medium 日期 ____ / ____ / ____ :
 - 操作前 30 min 準備：
 - 配置冷凍保存液:
 - 取 3 份 DMEM 加入 tube 中，冰浴下搖晃緩緩加入 1 份 DMSO，後再加入 4 份 FBS (因為加入 DMSO 會放熱，因此須在冰浴中依順序加入)
 - 冷凍小瓶以 2B 鉛筆標示**細胞株名、六位數日期、操作者**或列印在標籤貼紙 (不可使用噴墨印表機)
 - 以 75 %酒精擦拭 Laminar flow 桌面後開 UV 至開始操作時關閉
 - 洗手，雙手與 CO₂ incubator 外門縫噴酒精，取出 Flask，鎖緊蓋子，以顯微鏡鏡檢確定細胞長到 8 分滿。
 - 沖下細胞**: 打開 Flask 蓋子夾於指間或置於乾淨桌面，以無菌滴管伸入，吸起原有 medium，盡量沖下壁上細胞。
 - 離心分離**: 將沖下細胞的 medium 小心倒入新的 50 mL tube，以 300 rcf 離心 5 min 後倒上清液。
 - 以掌心輕握維持其溫度，左手持 tube，右手以指腹輕敲震動 tube 尖端打散細胞。
 - 加冷凍保存液**: 將 tube 於冰浴下搖晃，1 min 內緩緩加入 5 mL 冷凍保存液 (假設要分裝成 5 個冷凍小瓶)。
 - 分裝細胞冷凍保存液**: 打開冷凍小瓶，以 Pipetman 吸 1 mL 到冷凍小瓶後旋緊蓋子。
 - 移至-80°C 冰箱**: 置於保麗龍中(15 mL tube 所附之底座)，以報紙包覆，標識姓名、細胞株名稱及冷凍時間後放入-80°C 冰箱 (需緩慢降溫，以免冰晶產生；注意瓶口朝上，以免解凍時爆裂!)
 - ____ / ____ / ____ 隔天移到液態氮桶永久保存，並登錄保存位置。
 - ____ / ____ / ____ 至少 2 週後解凍 1 瓶繼代，確定此批冷凍成功。
- * 細胞株經多次繼代會變性，因此要冷凍保存，通常每株凍 2 個冷凍小瓶。
 * 一個 T25 flask 的細胞通常可分為 3 個冷凍小瓶，T75 通常分 5 瓶。

Reference:

John E. C., Barbara E. B., David H. M., Ethan M.S., and Warren S. (eds.) 2009. Current Protocol in immunology. John Wiley and Sons. Inc.

日期	操作者	QC