細胞冷凍保存

1. 前言：

   1.1. 欲冷凍保存之細胞應在生長旺盛（例如 log phase）且存活率高之狀態，約為 80％ - 90％緻密度。

   1.2. 冷凍前檢測細胞是否仍保有其特有性質，例如 hybridoma 應在冷凍保存前一至二日測試是否有抗體之產生。

   1.3. 一般冷凍保護劑為 5~10% DMSO。應注意冷凍保護劑之品質，DMSO 應為 tissue culture 等級，無色且無菌（以 0.22 micron FGLP Telflon filter 過濾或是直接購買無菌產品）。若為大體積包裝，將其以少量分裝，4℃避光保存，勿作多次冷凍解凍循環。

   1.4. 冷凍保存之細胞濃度：1~5 x 10^6 cells/ml

   1.5. 若是不確定細胞之冷凍條件，在做冷凍保存之同時，亦應作一個 backup culture，若冷凍失敗，仍有預留之細胞存在。

2. 材料：

   2.1. 新鮮培養基

   2.2. DMSO

   2.3. 無菌塑膠冷凍保存管

   2.4. -20℃ 冰箱

   2.5. -80℃ 冰箱

   2.6. 程式降溫機 (可有或無)

3. 步驟：

   3.1. 冷凍前應注意細胞生長情形，可在一日前更換半量或全量培養基。

   3.2. 配製冷凍保存溶液（使用前配製）：將 DMSO 加入新鮮培養基中，使其最終濃度為 5~10％，混合均勻，置於室溫下待用。

   3.3. 依細胞繼代培養之操作，收集細胞，並取少量細胞懸浮液計數細胞濃度及凍前存活率。

   3.4. 將收集之細胞離心 1000 rpm、5 分鐘後，去除上清液，加入適量冷凍保存溶液，混合均勻後，使細胞濃度為 1~5 x 10^6 cells/ml，分裝至冷凍保存管中， 每管分裝 1 ml。

   3.5. 冷凍保存方法 1：冷凍管置於 4℃、 10~30 分鐘 →移至-20℃、30 分鐘** → 移至-80℃、16～18 小時（或隔夜）→移至液氮槽 vapor phase

長期儲存。

** 註：-20℃不可超過 1 小時，以防止冰晶過大，造成細胞死亡。亦可跳過此步驟，冷凍管置於厚保麗龍盒內，直接放入-80℃冰箱，但存活率會降低。

3.6. 冷凍保存方法 2：冷凍管置於已設定程式之程式降溫機中，以每分鐘降 1~3℃速率降至-80℃以下，然後放入液氮槽之 vapor phase 長期儲存。

冷凍細胞活化

1. 前言：

   1.1 冷凍細胞之活化原則為快速解凍，以避免冰晶對細胞造成傷害。

   1.2 細胞活化後，約需數日，或繼代一至二代，其細胞生長或特性表現才會恢復正常（例如產生單株抗體或是其他蛋白質）。

2. 材料：

   2.1 恆溫水槽

   2.2 新鮮培養基

   2.3 無菌吸管 / 離心管 / 培養瓶

   2.4 液氮或乾冰容器

3. 步驟：

   3.1 將新鮮培養基置於 37°C 水槽中回溫(或其他適當之培養溫度)，回溫後以 70% ethanol 擦拭之，移入無菌操作台內。

   3.2 操作人員應戴防護面罩及手套，自液氮或乾冰容器中取出冷凍管，防止冷凍管可能爆裂之傷害。

   3.3 取出冷凍管，立即放入 37°C 水槽(或其他適當之培養溫度)中快速解凍，輕搖冷凍管使其在 1~3 分鐘內全部融化，以 70% ethanol 擦拭保存管外部，移入　無菌操作台內。

   3.4 依據細胞種類和濃度，於無菌操作台內取適量培養基加至適當之培養瓶中，緩慢加入已解凍之細胞懸浮液(一般稀釋比例為 1:10～1:15)， 與培養基混合均勻後，放入培養箱培養。可另取樣少許解凍細胞懸浮液作存活測試。

   3.5 解凍後是否立即去除冷凍保護劑 (例如 DMSO 或 glycerol)，依細胞種類而異。對大多數細胞株而言，不需要立即去除冷凍保護劑。若要立即去除，則將解凍之細胞懸浮液加入含有 5~10ml 培養基之離心管內，離心 1,000 rpm、5 分鐘後，移去上清液，加入新鮮培養基，混合均勻，放入培養瓶內，置於 適當之培養箱培養。

   3.6 若不需立即去除冷凍保存劑，則在解凍培養隔日後更換培養基即可。