

動物細胞的冷凍保存

翻譯自:ATCC connection (2004) 24(2):10-11

翻譯者:陳欣怡/生資中心 助理技師

審譯者:黃效民/生資中心 資深研究員

大多數的細胞若無特別的要求，都可冷凍保存於-130°C 以下長達多年。正確的冷凍保存步驟和方式要比投資於設備及試劑重要多了，例如建立安全庫存（safety stock），保存繼代數低的細胞，防止細胞特性的改變，及提供和使用標準的試劑以供連貫性的實驗。

概觀:

當含細胞之懸浮液的溫度低於凝固點時，冰晶會開始形成而溶質的濃度也相對的增加，如果細胞內的水分可以在降溫過程中滲透出來，則細胞內的冰將會減少，緩慢的冷卻速度，大致是以每分鐘降 1°C，可使細胞內的水分更容易在降溫過程中滲透出來；然而，細胞體積會因流失水分而縮小，若縮到一定程度以下，則細胞會很快的失去生存能力。添加冷凍保護劑如甘油或 DMSO 則可減緩此現象。

標準的冷凍保存細胞程序是將細胞置於加有冷凍保護劑的培養基中，緩慢的冷凍細胞直到溫度低於-70°C。之後，再將冷凍管移至液氮槽中以維持低於-130°C 的溫度。

解凍細胞則是非常簡單直接:將含細胞冷凍管由液氮槽中取出，立刻在 37°C 的水浴槽中快速解凍，移入無菌操作台內直接加入生長培

養基稀釋培養或溫和的離心去除冷凍培養基，再種入加有完整生長培養基的培養瓶中培養。

有很多的因素會影響解凍後細胞的存活率，不同的細胞株可能需部分修改冷凍保存的步驟和方法以提高細胞解凍後的存活率。某些關鍵的要素可提供較佳的存活率，例如冷凍培養基的組成，細胞生長期(growth phase)，細胞週期(cell cycle)狀態以及冷凍培養基中的細胞數和細胞濃度。

冷凍培養基

5%至10%的甘油或DMSO(dimethyl sulphoxide)是最常用的冷凍保護劑，雖然DMSO對細胞有毒性，但卻比甘油能更快穿透細胞且結果的再現性較佳，然不幸的是，DMSO會造成某些細胞的分化(如HL-60，前骨髓母細胞)，以及對一些細胞毒性太強(HBE4-E6/E7，肺表皮細胞)，此時以使用甘油較佳。甘油可以高溫滅菌，而DMSO則必須以過濾方式除菌，在使用DMSO時要格外小心，因為它可快速穿透接觸的皮膚，而將有毒物質也一起帶入體內。

特別需注意的是，必須使用試劑級(或更高級，如細胞培養等級)的DMSO或甘油，開瓶後需分裝儲存且避光。ATCC有提供細胞培養等級的DMSO (Cat#:4-X)，而且是經過測試以確保其無毒性。對於使用無血清培養的細胞，應添加50%的條件培養基 (conditioned

medium，以無血清培養基培養細胞 24 小時後回收的培養液)到冷凍培養基及解凍培養基，以增加細胞解凍後的存活。添加 10 到 20%細胞培養等級的牛血清蛋白(BSA, bovine serum albumin)至無血清冷凍培養基也可提升冷凍後的存活。

其他的冷凍培養基配方，則包括了高濃度血清(如 90%血清)，以提供額外的生長激素和冷凍保護作用，另外使用低溫設計配方的 balanced salt solution，或抑制細胞凋亡作用的添加劑可延緩解凍細胞的死亡。對每一株特定的細胞最適合的配方，必須實際實驗測試。

設備

冷凍管

關於冷凍管的材質有兩種選擇：玻璃或塑膠。玻璃管較麻煩，需要先滅菌才能使用，且無標籤，在封管時須使用火焰將管口熔融密封，若不慎掉落容易破裂，也不易開管。然而，玻璃管能保存較久且若密封完全可視為零故障的保存方式。ATCC 將細胞株的種子細胞保存於玻璃管，而分讓細胞則保存於塑膠管。

塑膠管有兩種樣式：一種是內螺紋含矽膠墊圈，另一種則是外螺紋的。剛開始市場上僅有內螺紋塑膠管，可是卻比外螺紋塑膠管擁有一些不利的條件，舉例來說，矽膠墊圈雖提供了很好的封口，但蓋子需要轉的剛剛好緊，太緊或太鬆都會滲漏。

可控速降溫機 **Controlled-rate freezer chambers**

有很多方法可達到一分鐘降 1°C 的降溫速率，其中最好的方式應該是使用以電腦控制的程式降溫機(e.g., CryoMed Freeze)，ATCC 就是使用此方式。然而此設備並不便宜，但是對於某些敏感之細胞是絕對必須的。也有較便宜的方式則是將冷凍管置於隔熱的盒子中，放入 -70°C(或低)的冰箱冷卻 24 小時，也有一些商品化冷卻產品可達到接近降溫速率為一分鐘降 1°C 的理想 (Mr. Frosty, Nalgene Catalog #5100-0001; StrataCooler, Stratagene Catalog # 400005)。另外，冷凍管也可置於厚 15 公釐 (3/4 英吋)，容量 1 公升的保麗龍盒子中，其中再添加一些紙張、厚棉或保麗龍顆粒達到減緩降溫速度的目的。

保存

長期保存於超低溫(低於-130°C)時，需使用特別的冰箱或液氮槽。液氮槽的保存方式有兩種：一種是將冷凍管浸入液氮中，另一種則是將冷凍管置於氣相層中液氮。浸入液氮中的方式可保有比較多的液氮，因而需要較少的注意和充填維護，然而，當液氮進入沒封好的冷凍管時，在取出時可能會發生氣爆(譯者註：易容易造成細胞污染)，基於這因素，ATCC 強烈的建議將冷凍管保存於液氮槽的氣相層中。

氣相層的系統中會在容器內產生溫度差的現象，液氮槽的最底層

會達-196°C，而上方的溫度則會依液氮的多寡及開桶的次數而不同，爲了確保安全的保存細胞，桶內一定要有足夠的液氮，這樣才能使上方的溫度也能低於-130°C。所有的保存系統都應備有溫度警報器。

冷凍保存的程序

以下的程序適用於大多數的細胞培養，另可以依照細胞株不同的需求而做改變。ATCC 細胞株的冷凍培養基配方提供於產品說明單上，細胞進行冷凍保存前，應處於對數生長期，即生長旺盛且良好之狀態

1. 在冷凍保存前先測試細胞是否有受到細菌、霉菌、黴漿菌及病毒的感染。大多數的時候，測試結果將會在細胞冷凍後才得知，這時，若確實有感染時，則將冷凍的細胞銷毀。
2. 準備好含有 5% DMSO 的冷凍培養基，切勿將 DMSO 直接加入細胞液中，因 DMSO 加入液體中會釋放出大量熱能。
3. 溫和的離心(10 min at 125x g) 將細胞上清液去除後，重新稀釋於冷凍培養基，且維持每毫升活細胞濃度 1×10^6 到 5×10^6 。另外維持部分細胞繼續培養，直到解凍後的細胞存活率已確認(參照步驟 9)。
4. 標示細胞株的名稱及日期於冷凍管上，每管約加入 1 到 1.8 毫升的細胞懸浮液(視冷凍管的大小而定)並封緊。

5. 室溫下，讓細胞在冷凍培養基中達到平衡，最少 15 分鐘但不得超過 60 分鐘，通常就是分配細胞懸浮液至各冷凍管所花的時間，超過 60 分鐘，DMSO 可能會使細胞的活性降低。
6. 將冷凍管放入冷凍盒中，且將冷凍盒放進-70°C 的冰箱至少 24 小時，另外也可使用可程式降溫機，將其設定在每分鐘降 1°C，直到溫度低於-70°C 為止。
7. 迅速的將冷凍管移到液氮槽或-130°C 的冰箱，如果冷凍管待在-50°C 以上的環境下，冷凍物質將會以每分鐘上升 10°C 的速率溶解而對細胞造成傷害。
8. 紀錄冷凍的位置及細節。
9. 等到細胞在-130°C 冰箱或液氮槽中超過 24 小時後，移出一管冷凍管作培養，以測定細胞之存活率。

冷凍保存細胞的活化

冷凍管中細胞懸浮液的解凍活化必須越快越好，而且儘速加入完整的培養基，即種入適當的培養瓶(flasks)。雖解凍的單層細胞也可活化於多孔盤(multiwell plates)，但結果並不比培養瓶來的好。

有些細胞株，像是解凍後的融合瘤細胞則需多培養幾天後才能完全恢復，的確，有些融合瘤細胞在解凍後第一天看起來有死亡的現象

且會有很多細胞碎片。大多數細胞在解凍 24 小時內的存活率會下降且達到最低點，會出現此現象，可能是冷凍保存過程中對細胞產生的破壞而導致細胞凋亡作用。渡過這段時間，細胞則開始恢復，且以指數方式增加。

1. 將冷凍管移出液氮槽且在 37°C 或在該細胞株正常生長溫度的水浴槽中溫和的搖動，快速的解凍（大約 1~2 分鐘）。
2. 一旦管內物質溶解後，將冷凍管移出水浴槽且浸入或噴 70% 酒精來消毒。接下來所有的步驟將在生物安全櫃中進行，在嚴格無菌的狀態下操作。
3. 準備好培養瓶（例如 T-75 flask），並加入已預熱的 15 毫升的培養基。
4. 打開冷凍管的瓶蓋，將細胞懸浮液取出加入培養瓶內直接培養，或溫和的離心(10 min at 125x g)以去除抗凍劑，將上清液移除後，重新將細胞稀釋於 1 至 2 毫升的培養基中，再將此細胞懸浮液加入裝有培養基的培養瓶中混合均勻。
5. 於 24 小時後觀察，而需要時做繼代培養。