

Cell Freezing Medium – Glycerol

Minimum Essential Medium Eagle
 With 10% glycerol
 With 10% bovine calf serum (BCS)

Catalog Number **FM 001-04**
 Storage Temperature -5~-20°C

Product Description

Cell Freezing Media is used for freeze storing animal cells in liquid nitrogen. Cell Freezing Media contains serum supplements and freeze resistance reagents such as dimethyl sulfoxide and glycerol. When freezing animal cells using the Cell Freezing Media, all cells should be trypsin treated or suspended in Cell Freezing Media after centrifuging prior to storage.

FM 001-04 contains 10% glycerol and 10% BCS in MEM base. Examine the culture for the absence of contamination, healthy growth confluency, etc.

Storage/Stability

The Cell Freezing Medium should be stored at -5~-20°C in the dark. Deterioration of the solution may be recognized by (1) precipitate or particulate matter throughout the solution, (2) cloudy appearance, (3) color change, and/or (4) pH change. Product label bears expiration date.

Biological Performance Characteristics

The growth-promoting capacities of Cell Freezing Medium are cell growth tested cell thawing after freezing. Growth rates are examined through three subculture generations and compared with parallel cultures grown in standardized control medium. Cells are counted and growth is plotted as a logarithmic function of time in culture, and seeding efficiency, doubling time, and final cell density are determined. During the testing period cultures are examined microscopically for a typical morphology and evidence of cytotoxicity.

Precautions

For *In Vitro* Use Only

Freezing Protocol

If freezing adherent cells

1. Remove culture medium. Wash the cell by DPBS (**LB 001-02**) or HBSS (**LB 003-03**, **LB 003-04**).
2. Cells, remove using Trypsin or Trypsin-EDTA for 1~3 minutes at 37°C. And completely remove Trypsin or Trypsin-EDTA by centrifugation cells at 80 xg for 2~3 minutes.
3. Resuspend cells gently in an appropriate volume of culture medium. And remove remaining Trypsin or Trypsin-EDTA by centrifugation cells at 80 xg for 2~3 minutes.
4. Resuspend cells gently in an appropriate volume of Cell Freezing Medium.
5. Dispense the cell suspension in 1~2 mL aliquots in plastic freezing vials or glass ampules.
6. Place vials in an insulated container and store in freezer for cooling rate -1°C/minute. Transfer vials to vapor phase of liquid nitrogen and store for 24 hours before transferring to liquid phase.
7. Cell viability count should be performed by melt the vial.

If freezing suspension cells

1. Remove culture medium by centrifugation cells at 80 xg for 2~3 minutes. Resuspend cells gently in an appropriate volume of Cell Freezing Medium.
2. Dispense the cell suspension in 1~2 mL aliquots in plastic freezing vials or glass ampules.
3. Place vials in an insulated container and store in freezer for cooling rate -1°C/minute. Transfer vials to vapor phase of liquid nitrogen and store for 24 hours before transferring to liquid phase.
4. Cell viability count should be performed by melt the vial.

Frozen cell's culture

1. Remove vials from freezer and rapidly thaw in a 37°C water bath.
2. If DMSO or glycerol need remove, discard supernatant by centrifugation cells at 80 xg for 2~3 minutes. If DMSO or glycerol need not remove, resuspend cells of culture medium without centrifugation.
3. Transfer cells to a culture flask and slowly add the appropriate volume of growth medium.
4. Cultivate cell in incubator.

Product Profile	
Endotoxin	≤ 1.0 EU/ml
Sterility	Sterilized by 0.2 μm filtration system. Sterility tests are performed in accordance with protocols described in USP.

Cell Freezing Medium – Glycerol

Minimum Essential Medium Eagle
With 10% glycerol
With 10% bovine calf serum (BCS)

Catalog Number **FM 001-04**
Storage Temperature -5~-20°C

제품설명

세포 배양시 보통 일만개에 한 개의 비율로 돌연변이체가 생기며 장기간에 걸쳐 계대 배양을 계속하게 되면 본래의 세포 집단과는 전혀 다른 세포 집단으로 변할 수 있다. 이러한 유전적 변이를 최소화하고 노화와 형질전환을 방지하는 등 세포주를 안정하게 보존하고 또한 오염에 의한 소실을 방지하기 위해서 세포의 동결 보존은 반드시 필요하다. 세포의 동결 보존시 세포에 내동성을 부여하기 위해서 **dimethyl sulfoxide (DMSO)** 또는 **glycerol**을 첨가하는데, **glycerol** 보다 **DMSO**가 더 효과가 있는 것으로 알려져 있으며 5~10% 농도로 배양배지에 첨가한 **freezing medium**을 많이 사용하지만 세포에 따라 농도는 달라질 수 있다.

FM 001-04는 MEM (Minimum Essential Medium Eagle)을 기본조성으로 하여 **glycerol**이 10% 되게, 또한 **BCS**가 10% 되게 각각 첨가되어있다.

동결 보존할 세포는 보존전에 오염 여부를 확인하여야 하고 대수 증식기(log phase)에 있는 활성적인 세포를 이용하며 고밀도($5 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$ cells/ml)로 저장한다. 동결시 감온 속도는 세포에 따라 다르며 보통 -1°C/min 속도로 동결한다. **Programmed cooler**를 이용하거나 또는 솜을 채운 **ice box**에 저장할 세포가 포함된 **vial**을 넣고 -70~-90°C의 **deep-freezer**에 정치한 후 액체 질소로 옮김으로써 동결 보존을 완료할 수 있다. 액체 질소는 증발이 잘 되므로 정기적으로 그 수위를 검사하고 다시 채우는 등의 관리가 필요하다.

보관 및 안정성

Cell Freezing Medium은 차광하여 -5~-20°C에서 보관하여야 한다. **Cell Freezing Medium**의 변성은 (1) 침전물 또는 부유물, (2) 용액의 탁해짐, (3) 색의 변화, 그리고 (4) pH의 변화 등으로 나타날 수 있다. 추가로 첨가하는 첨가제의 성질에 의해 보관조건 및 배지의 유효기간이 바뀔 수 있다. 유효기간은 제품 라벨에 표시 되어있다.

생물학적 특성

Cell Freezing Medium의 속성은 세포저장 후의 다시 해동하여 시험한다. 성장 속도는 세 번의 계대 배양을 통하여 측정하고 표준품에서 배양한 것과 비교한다. 시간에 따른 세포수의 변화를 측정하고 **seeding efficiency**, **doubling time**, 그리고 최종 세포농도를 결정한다. 시험을 하면서 현미경으로 세포의 형태 변화와 **cytotoxicity**의 현상이 나타나지 관찰한다.

주의

For *In Vitro* Use Only

세포의 동결 저장 부착세포의 경우

1. 배양 배지를 제거하고 Ca^{2+} 와 Mg^{2+} 가 없는 **DPBS (LB 001-02)** 또는 **HBSS (LB 003-03, LB 003-04)**로 세포 단층을 씻어 낸다.
2. Trypsin 또는 Trypsin-EDTA를 처리하여 세포를 탈착시키고 80 xg에서 2~3분간 원심하여 Trypsin 또는 Trypsin-EDTA를

완전히 제거한다.

3. 배양 배지로 세포 침전을 현탁하고 다시 80 xg에서 2~3분간 원심하여 잔존한 Trypsin 또는 Trypsin-EDTA를 제거한다.
4. 세포침전에 **Cell Freezing Medium**을 첨가한후 pipetting을 통하여 세포를 충분히 현탁한다.
5. 세포 현탁액을 **cryotube**에 분주한다.
6. -1°C/min 속도로 동결한 후 액체 질소로 옮긴다.
7. 액체 질소에 동결저장된 **vial**을 녹여서 세포 생존율 및 증식을 확인한 후 동결보존을 완료한다.

부유세포의 경우

1. 80 xg에서 2!3분간 원심하여 배양상층액을 버리고 세포 침전을 **cell freezing medium**에 현탁한다.
2. 세포 현탁액을 **cryotube**에 분주한다.
3. -1°C/min 속도로 동결한 후 액체 질소로 옮긴다.
4. 액체 질소에 동결저장된 **vial**을 녹여서 세포 생존율을 확인한 후 동결보존을 완료한다.

*원심속도는 세포에 따라 달라질 수 있다.

동결 저장된 세포의 배양

부착 세포의 경우 (37°C에서 배양하는 세포의 경우)

1. 37°C 수조에서 배지를 미리 향온한다.
2. 동결 보존 세포를 포함한 **vial**을 액체 질소에서 꺼내는 즉시 37°C 향온 수조에서 재빨리 해동시킨다.
3. **DMSO**나 **glycerol**을 제거하고자 할 경우에는 80 xg에서 2~3분간 원심하여 상층액을 버리고 새로운 배지에 세포를 현탁한다. **DMSO**나 **glycerol**을 제거하지 않아도 될 경우에는 원심하지 않고 새로운 배지에 세포를 현탁한다.
4. 배양 용기에서 배양한다.
5. 다음날 새로운 배지로 교환한다.
6. 현미경으로 세포를 관찰하며 2~3일마다 새로운 배지로 교체해주고 세포가 배양 용기를 꽉 채우게 되면 계대 배양한다.

부유 세포의 경우 (37°C에서 배양하는 세포의 경우)

1. 37°C 수조에서 배지를 미리 향온한다.
2. 동결 보존 세포를 포함한 **vial**을 액체 질소에서 꺼내는 즉시 37°C 향온 수조에서 재빨리 해동시킨다.
3. **DMSO**나 **glycerol**을 제거하고자 할 경우에는 80 xg에서 2~3분간 원심하여 상층액을 버리고 새로운 배지에 세포를 현탁한다. **DMSO**나 **glycerol**을 제거하지 않아도 될 경우에는 원심하지 않고 새로운 배지에 세포를 현탁한다.
4. 배양 용기에서 배양한다.
5. 다음날 새로운 배지로 교환한다. 이때는 원심하여 배양액을 버리고 새로운 배지로 세포 침전을 현탁하여 배양용기에서 배양한다.
6. 현미경으로 세포를 관찰하며 2~3일마다 새로운 배지로 교체해주고 세포의 개수를 측정하여 일정 수준 이상이 되면 계대 배양한다.

*원심속도는 세포에 따라 달라질 수 있다.

Product Profile	
Endotoxin	≤ 1.0 EU/ml
	Sterilized by 0.2 μm filtration system.
Sterility	Sterility tests are performed in accordance with protocols described in USP.