

## 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 001-04**는 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°C**의 **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°C**에서 보관하여야 한다. Cell Freezing Medium의 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

- 배양 배지를 제거하고 **Ca<sup>2+</sup>**와 **Mg<sup>2+</sup>**가 없는 **DPBS (LB 001-02)** 또는 **HBSS (LB 003-03, LB 003-04)**로 세포 단층을 씻어 낸다.
- Trypsin** 또는 **Trypsin-EDTA**를 처리하여 세포를 탈착시키고 80 xg에서 2~3분간 원심하여 **Trypsin** 또는 **Trypsin-EDTA**를

완전히 제거한다.

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

#### 부유세포의 경우

- 80 xg에서 2~3분간 원심하여 배양상층액을 버리고 세포 침전을 cell freezing medium에 현탁한다.
- 세포 현탁액을 **cryotube**에 분주한다.
- 1°C/min** 속도로 동결한 후 액체 질소로 옮긴다.
- 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)

- 37°C 수조에서 배지를 미리 향온한다.
- 동결 보존 세포를 포함한 **vial**을 액체 질소에서 꺼내는 즉시 37°C 향온 수조에서 재빨리 해동시킨다.
- 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.
- 배양 용기에서 배양한다.
- 다음날 새로운 배지로 교환한다.
- 현미경으로 세포를 관찰하며 2~3일마다 새로운 배지로 교체해주고 세포가 배양 용기를 꽉 채우게 되면 계대 배양한다.

##### 부유 세포의 경우 (37°C에서 배양하는 세포의 경우)

- 37°C 수조에서 배지를 미리 향온한다.
- 동결 보존 세포를 포함한 **vial**을 액체 질소에서 꺼내는 즉시 37°C 향온 수조에서 재빨리 해동시킨다.
- 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.
- 배양 용기에서 배양한다.
- 다음날 새로운 배지로 교환한다. 이때는 원심하여 배양액을 버리고 새로운 배지로 세포 침전을 현탁하여 배양용기에서 배양한다.
- 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.