



## 凍結 NK 細胞 解凍手順

ver.04

### 【試薬】

RPMI1640 培地 (10%FBS 含有、IL-2 不含)、FBS (ウシ胎児血清、56°C30 分にて不活化済み)、トリパンプルー溶液 (必要に応じて)、継代培地 (バイオセラピー研究所、N201 推奨)

### 【資材・機器類】

15mL コニカルチューブ、50mL コニカルチューブ、1.5mL チューブ x2 本、小フラスコ (培養面積 25cm<sup>2</sup>)、中フラスコ (培養面積 75cm<sup>2</sup>)、ラプトップクーラー (4°C設定)、ヒートブロック (37°C設定)

### 【手順】

1. クライオチューブ 1 本分につき、1 本の 15mL コニカルチューブに 4°Cで保存された RPMI 培地を 9mL 分注する。
2. 凍結細胞を液体窒素から取り出し、ヒートブロックでクライオチューブを加熱して、迅速に凍結細胞液を解凍する。(ヒートブロックがない場合には掌にて温めて解凍する。) 凍結細胞の氷塊が完全に溶けた瞬間にすみやかにクライオチューブを 4°Cに設定したラプトップクーラーに移す。
3. クライオチューブに入っている融解した細胞懸濁液を、空の 15mL チューブに静かに移す。
4. RPMI1640 培地が分注されている 15mL コニカルチューブから 1mL とり、細胞懸濁液の入っているコニカルチューブを静かに揺らしながら 1 滴ずつ静かに滴下する。その後、残りの 8mL の RPMI1640 培地を、コニカルチューブを揺らしながら静かに滴下する。
5. 1000rpm、10 分間、室温で遠心する。
6. 継代培地を 10mL 用意する。
7. 遠心分離後のコニカルチューブの上清をデカンテーションで除去し、沈殿成分をタッピングによりほぐす。



## 凍結 NK 細胞 解凍手順

ver.04

8. 沈殿細胞成分に継代培地 10mL を加え、ピペットで静かに 2~3 回混和する。この際、1.5mL チューブに一部取り、細胞数、生存率をカウントする。
9. 以下の条件になるように、添加する培地量、FBS 量を計算する。
  - ・ 細胞密度：  $2.0 \times 10^6$  cells/mL
  - ・ FBS 濃度： 10%
10. 必要な小フラスコ、または中フラスコ、継代培地を準備する。
11. フラスコに適量の培地と FBS を添加する。
12. 37°C、5%CO<sub>2</sub> に設定されたインキュベータにフラスコを入れ、培養を開始する。
13. 2~3 日培養して、NK 細胞を使用する。