Code No. VPL-A1

ES/iPS Cell Cryopreservation Solution

StemCell Keep

Protocol

StemCell Keep is a suitable ready-to-use **vitrification solution** for human ES/iPS cell preservation. Human ES/iPS cells are very sensitive for freezing and thawing damage and their survival rate after cryopreservation by slow cooling is quite low. So vitrification is recommended for preservation of these cell lines. *StemCell Keep* has been developed for high efficient, low toxic and easy handling vitrification solution without any protein and DMSO which might affect differentiation.

Kit Components:

Name	Size	Note
StemCell Keep	20 mL	Containing no DMSO and proteins

Usage

1. Freezing of ES/iPS cell colonies suspensions

(1) Prepare liquid N_2 in the clean bench.
(2) Centrifuge suspended media of ES/iPS cell colonies and pellet them by elimination of supernatant at 4 ~ 10 ℃.
(3) Resuspend the cell pellet with 200μL of *StemCell Keep*.
(4) **Pipette the cell suspension into a cryotube and <u>immediately put it to liquid N_2 directly.</u>** (If the successful vitrification would be achieved, the solution should be kept transparent after freezing.)
(5) Transfer the cryotube into a liquid nitrogen chamber (-196 ℃).

2.Thawing from preserved state

(1) Keep the vials to be thawed in the liquid N_2 in the Dewar vessel.
(2) Add the pre-warmed (37℃) media (1mL) directly to the vial immediately after taking out from liquid N_2.
(3) Thaw the solution by gentle pipetting and add into the excess amount of medium. Centrifuge and plated the colonies on the feeder cell layer in a culture dish and culture in an incubator.

Expiration:

StemCell Keep can be used for 2 years after the manufacture date if stored properly at lower than 10 ℃.

Storage:

Left-over solution can be stored at 4 ℃ or –20 ℃ for 2 years without loosing its functional quality.

Precautions:

- This product is for research use only.
- We, BioVerde, are not liable to any accidents or damages caused by improper usage of the product.

Quality Control:

Bacterial tests:
Bacteria, fungi or mycoplasma contamination is all negative.

Chemical tests:
(1) pH = 6.7 ~ 8.0 at RT
(2) Endotoxin < 0.5 EU/mL

Ordering Information:

Product	Package Size	Code No.
StemCell Keep	**20 mL**	**VPL-A1**

***BioVerde*, Inc.**
43-1 Minamimatsunoki-cho,Higashikujo,Minami-ku,Kyoto
601-8023 JAPAN Phone/FAX: +81-75-644-9009

DMSO・タンパク質不含霊長類 ES/iPS 細胞凍結保存液

StemCell Keep

ステムセルキープ

使用説明書

霊長類・ヒトの ES 細胞や iPS 細胞は通常の 10%DMSO 溶液で-80℃冷凍庫にて凍結するときわめて生存率が低いことが報告されています。そこで、これらの細胞は、**ガラス化法（Vitrification）**という特殊な方法で凍結するとある程度の生存率を得ることがわかっています。ステムセルキープは、霊長類 ES/iPS 細胞のガラス化凍結保存に最適な組成を設計し、簡易な手法でより再現性良く高い生存率が得られるに開発された保存液です。しかも毒性の低い新規な凍結保存剤が添加されているため、DMSO やタンパク質を全く含みません。これにより安全で効率的な凍結保存が実現できます。

製品概要：

製品名	製品番号	包装単位	備　　考
ステムセルキープ	VPL-A1	20 *ml*	DMSO・血清無添加

使用方法：

１．細胞の凍結

（１）　ほぼコンフルエントになった ES/iPS 細胞を準備する。

（２）　液体窒素をデュワー瓶もしくは発泡スチロールの容器などに入れ、クリーンベンチの近くに準備する。クライオバイアルを凍結する本数準備する。

（３）　培地を除去し、ES 細胞用はく離液（0.25%トリプシン、1mg/mL コラーゲナーゼ IV、1mM$CaCl_2$）を 1-2mL 添加、５分程度インキュベートし、コロニーの状態ではく離する。

（４）　培地を 2-3mL 添加、コロニーをはがし培地を添加し、凍結する本数分に分けて遠心（この際コロニーをできるだけ小さくしないようにした方がよい）

以下の操作は１サンプルずつ行ってください。

（５）　上清をできるだけ除去する。ステムセルキープを 200μL 添加し、すばやくピペッティングし、凍結バイアルに移す。少し粘性があるので、細胞のペレットがくずれるまで何度かピペッティングを繰り返す。（1 分以内）

（６）　クライオバイアルのふたを閉め、ピンセットで凍結チューブを保持し、**液体窒素に浸漬する。**

（７）　内部まで凍結したら液体窒素のタンクもしくは-135℃以下のフリーザーに移す。

ガラス化が成功していたら液体は透明なままです。

2. 解凍

一回の操作で一本ずつ解凍してください。

（１）　あらかじめ培地を 37℃の湯浴で暖めておく。

（２）　解凍するバイアルの本数分の 15mL 遠心管に 10mL の培地を入れておく。

（３）　凍結した細胞のバイアルをデュワー瓶もしくは発泡スチロールの容器に入れた液体窒素中で保持しながらクリーンベンチ内に持って行く。

（４）　凍結バイアルをクリーンベンチ内で液体窒素から取り出し、ふたを開け、すぐに 37℃で暖めた培地を 1mL 添加し、ピペッティングにより溶解する。

（５）　遠心管に全量を加え、かく拌して遠心する。上清を除去し、培地を加える。

（６）　実験もしくは培養に使用する

3. 使用期限

製造日より 2 年

4. 製品貯蔵法

本保存液は、10℃以下で保管して下さい。

使用上の注意：

※　本製品は研究用以外の目的で使用しないで下さい。

※　使用に際しては、目的の細胞で事前に予備試験を行って下さい。

※　当社は、本製品の使用に起因する事故や損害に関しての責任を負いかねますのでご了承下さい。

品質保証：

１．無菌試験：

細菌、真菌及びマイコプラズマ混入なし

２．化学試験：

（１）水素イオン濃度（6.7～8.0 室温）

（２）エンドトキシン（0.5 EU/*ml* 以下）

製造元　***BioVerde***　株式会社バイオベルデ

〒601-8023 京都市南区東九条南松ノ木町 43 番 1

TEL/FAX：075-644-9009