

# Getico Cryopreservation Kit for Algae

## Getico 藻类冻存试剂盒

### 订购信息

产品名称	产品编号	规格	储存
Getico Cryopreservation Kit for Algae	131801	100次	2-8°C

### 产品描述

目前，藻类细胞保存的大多数方法都需要使用液氮储存的方法，但这种方法不方便且价格昂贵，需要不停地维持液氮的量。或者，也有研究人员选择连续培养来维持藻类克隆的活性，但这通常会导致污染和遗传漂变，并且不适合运输以及增加大量工作量。

使用-80°C冰箱低温保存是藻类保存及长期储存的最理想方法，因为其可以最大程度减少遗传漂变，有助于实验室内菌株和克隆的交换，并降低维护劳动量和成本，但是对试剂的要求很高。本公司开发的Getico藻类冻存试剂盒，提供了一种在-80°C冰箱下对藻类细胞进行长期储存或通过干冰运输的方法，并可确保细胞存活率。

Getico藻类冻存试剂盒可用于以简单的方式保存藻株和克隆达数十年以上，只需要使用-80°C冰箱，而无需使用液氮保存，可以降低保存成本，提高使用方便性。

只需将您的细胞在冻存试剂 A 中培养 2-5 天，收集起来，然后重悬于冻存试剂 B，接着使用梯度降温将一小份试剂在-80°C下冷冻即可。Getico藻类冻存试剂盒可用于保存衣藻及小球藻藻株等多种藻类样本，并可在解冻后实现 100% 的复苏率。

### 运输与保存

冰袋运输，2-8°C 保存，请勿冷冻。

### 操作步骤

#### 冷冻莱茵衣藻细胞

- 在标准培养条件下将莱茵衣藻细胞（野生型或转化体）培养至对数生长期中后期。
  - 将1 mL冷冻保存试剂A添加到45mL新鲜的莱茵衣藻培养基中，在250mL透明玻璃培养瓶中制备预处理培养基。
  - 将步骤1中的莱茵衣藻细胞接种到预条件培养基中，直至最终OD<sub>750</sub>为0.1（通常为2-5mL种子培养物）。OD<sub>750</sub>请勿超过0.4。
  - 将培养瓶置于藻类生长室中的旋转摇床上，转速设定为110rpm，温度为26°C，50 μE m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>，孵育 3 天。您可以让细胞在预条件培养基中生长 2-5 天，但最佳时间是3天。
  - 生长3天后，测量培养物的OD<sub>750</sub>，并使用以下公式计算细胞浓度。  
细胞浓度（细胞/mL）= (OD<sub>750</sub> - 0.088) / (9 × 10<sup>-8</sup>)
  - 可选：在光照条件下生长3天后，可将培养物移至昏暗光照条件下过夜孵育，然后收获（步骤 7，如下）。这一可选步骤可以增加冷冻过程中的细胞活力。
  - 以 2500 rpm 离心 5 分钟收获细胞，并小心地除去尽可能多的上清液。
  - 将细胞重悬于冷冻保存试剂B中，终浓度为2.5 × 10<sup>7</sup>个细胞/mL。此时开始计算孵育时间（室温下 30-45 分钟；参见下面的步骤 9）。
- 注意：不要超过5 × 10<sup>7</sup>个细胞/mL（浓度较高时细胞活力将显著降低）。
- 将240 μL细胞悬浮液精确等分到每个冷冻管中，并在室温下孵育 30-45 分钟。
  - 从Mr. Frosty® 冷冻容器中取出海绵插件，然后将灰色高密度聚乙烯小瓶支架插入到位。将含有细胞的冷冻管转移到Mr. Frosty® 冷冻容器中。如果您没有18个样品瓶来占据样品瓶支架的所有插槽，请用类似的充满液体的冷冻管填充其余插槽，以确保适当的冷却曲线。请勿向容器中注入100% 异丙醇或任何其他冷冻液体。
  - 将装有冷冻管的 Mr. Frosty® 冷冻容器移至 -80°C。将 Mr. Frosty® 冷冻容器放在冷冻室的开放空间上，以确保没有其他物体阻碍冷却过程。
  - 在接下来的 2 小时内，确保 -80°C 冰箱保持未打开门状态。在此期间打开冷冻室门会改变细胞的冷却曲线，并可能导致细胞活力下降。
  - 4 小时后，可以将冷冻管转移到另一个容器中，以便在 -80°C 下长期保存或保留在 Mr. Frosty® 冷冻容器中。
  - 细胞可在 -80°C 下保存至少 2 年。请注意，此冷冻方案也可能适用于其他种类的衣藻。

### 解冻莱茵衣藻细胞

1. 从  $-80^{\circ}\text{C}$  储存中取出冷冻细胞，立即放入干冰容器中。将装有细胞的小瓶埋在干冰中，以尽量减少解冻前的温度波动。
2. 将预热至室温的 200 mL 莱茵衣藻培养基添加到 500mL玻璃培养瓶中。
3. 从干冰储存器中取出含有冷冻细胞的冻存管，并立即将其放入 $35^{\circ}\text{C}$ 水浴中。
4. 在  $35^{\circ}\text{C}$  水浴中轻轻旋转小瓶，直至细胞完全解冻（1-2 分钟），从而快速解冻细胞。
5. 打开前，用 70% 乙醇擦拭小瓶外部。
6. 将 230  $\mu\text{L}$ 解冻的细胞从小瓶中转移至含有 200 mL G莱茵衣藻培养基的玻璃培养瓶中。
7. 将烧瓶放入设置为 $26^{\circ}\text{C}$  和  $50\ \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 的藻类生长室中。
8. 将细胞在设置为 110 rpm 的旋转摇床上振荡孵育 3-6 天。
9. 在第 3 天，计算细胞数量。如果培养物尚未达到 $1\times 10^6$ 个细胞/mL，则将其放回藻类生长室并继续孵育。每天检查培养物的细胞浓度，直至达到 $1\times 10^6$ 个细胞/mL。一旦培养物达到 $1\times 10^6$ 个细胞/mL，则继续进行转化步骤。

### 冷冻小球藻细胞

1. 在标准培养条件下，将 *C. vulgaris* 细胞（野生型或转化体）在100mL藻类培养基中培养至对数生长期中后期。
  2. 使用 Countess® 自动细胞计数器或您首选的方法确定细胞浓度和细胞总数。
  3. 2500 rpm 离心 5 分钟收获细胞，并小心地除去尽可能多的上清液。
  4. 将细胞重悬于冷冻保存试剂 B 中，终浓度为  $1\times 10^8$ 个细胞/mL。此时开始计算孵育时间（室温下30-45分钟；参见下面的步骤 5）。
- 注意：最终细胞浓度范围为 $1\times 10^7$  至 $2\times 10^8$ 个细胞/mL，而不影响冷冻细胞的活力