

Code No. 029-19161 (1 mL × 10)

Brain Tissue Freezing Medium

Brain Tissue Freezing Medium is appropriate for cryopreservation of rat or mouse embryonic brain tissue. Brain tissues may simply be cryopreserved by thawing the product and placing the tissue in the media. When culturing the neurons derived from cryopreserved tissues, we recommend that you use Neuron Dissociation Solutions (Code No. 291-78001, 297-78101) and Neuron Culture Medium (Code No. 148-09671).

[Component]

Component	Package
Brain Tissue Freezing Medium	1 mL × 10

[Reagent volume]

Animal	Kinds of tissue	Amount of tissue	Volume
Rat	Cerebral Hemisphere (embryonic day 17)	1 embryo	1 mL
	Cerebral Cortex (embryonic day 17)	2 embryos	
	Hippocampus (embryonic day 19)	2.5 embryos	
	Cerebral Striatum (embryonic day 17)	2 embryos	
Mouse	Cerebral Hemisphere (embryonic day 15)	1 embryo	
	Cerebral Cortex (embryonic day 15)	2 embryos	
	Hippocampus (embryonic day 16)	2.5 embryos	
	Cerebral Striatum (embryonic day 15)	2 embryos	

[Procedures]

< Precautions for use >

Please shorten the time from the dissection to Primary-cooling. The approximate time is within one hour. The cell viability is decreased as time proceeds after the dissection. Then the dead cells are removed when you isolate cells with Neuron Dissociation Solutions. Therefore the isolated cells are decreased. Please perform the procedures on ice.

< Preparation >

1. Fill a cooler (with a lid) with crushed ice.
2. Thaw this product at room temperature or 4 °C and store this product at 4 °C. Mix the medium before use.

< Dissection >

1. Narcotize the animals.
2. Sterilize the whole body (from whiskers to the tail) of narcotized animals with 70% ethanol.

3. Bring the animals in the clean booth with the stainless steel tray laid out by waste.
4. Take the embryos out from the animals and transfer them to the dish filled with L-15 solution. Cool them on ice until the next procedure.
※L-15 solution : Leibovitz's L-15 medium with 0.05 mg/mL gentamicin sulfate.
5. Transfer the embryo to the cover of the dish and pick up the brain tissues from the embryo quickly.
6. Transfer the brain tissues to the new dish filled with L-15 solution and cool them on ice.

< Primary-Cooling >

1. Place the Brain Tissue Freezing Medium and cooler near the clean bench.
2. In the clean bench, cover the brain tissues with the media and close the cap tightly.
3. Confirm that the tissues are immersed in this product. (Check the tissues from below. They should be easily visible.)
4. Put the tubes in the cooler so the tubes are in the crushed ice with only the lids showing.
5. Place the lid on the cooler and let the tubes sit for 90 minutes.

< Secondary-Cooling >

1. After Primary-Cooling, transfer the tubes from the ice to a freezer box.
2. Immediately place the freezer box in a -80 °C freezer. It is best to store directly on the bottom of a rack inside the freezer.
※Finish this procedure as quickly as possible to minimize temperature change.
※The tubes should be handled by the lids. Avoid touching the body of the tubes.
3. Store the tubes for 3 hours.
※Avoid opening and closing the freezer's door often during this time.

< Storage >

1. After Secondary-Cooling, transfer the tubes to a liquid nitrogen storage container from the -80 °C freezer as quickly as possible.
※The tubes should be handled by the lids. Avoid touching the body of the tubes.

< Thawing and Washing >

1. Remove the tubes from the liquid nitrogen storage container.
2. Thaw at room temperature. If the thawing time is shorter than 30 min, neurons may not thaw enough.
3. Remove Brain Tissue Freezing Medium from the tubes about 0.8 mL.
4. Add 1 mL of Washing Solution (Leibovitz's L-15 Medium or HBSS (+)) to the tubes, then transfer the thawed tissues and Washing Solution to a 15 mL centrifuge tube.
5. Add 4 mL of Washing Solution to the centrifuge tube.

- Let stand at room temperature for 5 min, and centrifuge at 300 rpm at room temperature for 1 min.
- Remove the supernatant, and add 5 mL of Washing Solution.
- Let stand at room temperature for 5 min, and centrifuge at 300 rpm at room temperature for 1 min.
- Dissociate and isolate neurons with Neuron Dissociation Solutions and culture them in Neuron Culture Medium.

[Storage]

Store at -80°C .

Avoid repeating freeze-thaw.

[Related Reagents]

Code No.	Product Name
291-78001	Neuron Dissociation Solutions
297-78101	Neuron Dissociation Solutions S
148-09671	Neuron Culture Medium
128-06075	Leibovitz's L-15 Medium with L-Glutamine, Phenol Red and Sodium Pyruvate
082-09365	HBSS(+) with Phenol Red

コード No. 029-19161 (1 mL $\times$ 10)

脳組織凍結保存溶液

本品はラット、マウス胎児の脳組織凍結保存用の凍結保存溶液です。

解凍後の本品に脳組織を入れるだけで脳組織を凍結保存可能です。

凍結保存した脳組織を培養する際は、解凍後、神経細胞用分散液（コードNo. 291-78001, 297-78101）にて分散し、神経細胞用培地（コードNo. 148-09671）を用いて培養して下さい。

[キット内容]

内 容	容 量
脳組織保存溶液	1 mL $\times$ 10

[試薬量の例]

動物種	組 織	組織量	試薬量
ラット	胎児大脳半球(胎生17日目)	1 四分	1 mL
	胎児大脳皮質(胎生17日目)	2 四分	
	胎児海馬(胎生19日目)	2.5 四分	
	胎児線条体(胎生17日目)	2 四分	
マウス	胎児大脳半球(胎生15日目)	1 四分	
	胎児大脳皮質(胎生15日目)	2 四分	
	胎児海馬(胎生16日目)	2.5 四分	
	胎児線条体(胎生15日目)	2 四分	

[操 作]

<使用上のご注意>

解剖開始から一次冷却開始までの時間は可能な限り短くして下さい。（目安として動物麻酔から脳組織を凍結保存溶液に入れるまでの時間を1時間以内にして下さい。）細胞生存率は胎児取出し後の時間経過に伴い低下します。神経細胞用分散液を用いた時には死細胞が除かれるため、回収細胞数が減少します。また、作業は可能な限り氷上で実施して下さい。

<準 備>

- 冷却用クラッシュアイス箱の準備。
発泡スチロールの箱にクラッシュアイスを一杯に入れたものを準備する。
- 凍結保存溶液を室温もしくは4℃にて解凍し、4℃保管しておく。

<解 剖>

- マウスもしくはラットに麻酔をかける。
- 麻酔がかかった動物を全身（髭・尻尾の先まで）70%エタノールにつけ殺菌する。
- キムワイブを敷いたステンレスバットなどでクリーンブース内に動物を持ち込む。

FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation

1-2, Doshomachi 3-Chome, Chuo-Ku, Osaka 540-8605, Japan
Telephone : +81-6-6203-3741
Facsimile : +81-6-6201-5964
<http://fwk.fujifilm.co.jp>

FUJIFILM Wako Chemicals U.S.A. Corporation **FUJIFILM Wako Chemicals Europe GmbH**
1600 Bellwood Road Fuggerstrasse 12
Richmond, VA 23237 D-41468 Neuss
U.S.A. Germany
Telephone : +1-804-271-7677 Telephone : +49-2131-3111-0
Facsimile : +1-804-271-7791 Facsimile : +49-2131-311100
<http://www.wakousa.com> <http://www.wako-chemicals.de>

4. 妊娠動物から胎児を取り出し、L-15液の入ったシャーレに入れる。シャーレとL-15液はあらかじめ4℃で冷やしておく。胎児の入ったシャーレは氷上に静置する。
※L-15液：終濃度0.05 mg/mL ゲンタマイシン硫酸塩を含むライボビッツL-15培地。
5. シャーレの蓋に胎児を移し、顕微鏡を用いて素早く脳組織を摘出する。
6. 解剖後の脳組織を別のL-15液の入ったシャーレに移し、氷上に静置する。

＜一次冷却＞

1. 冷蔵庫から本品と冷却用クラッシュアイス箱をクリーンベンチの近くに持ってくる。
2. クリーンベンチ内にて切り取った脳組織をピンセットで本品に入れ、チューブのふたをきつく閉める。
(脳組織を入れる前に保存溶液を混合する。)
3. 脳組織が保存溶液内に沈んでいるか確認する。
(確認する際はチューブの下から見上げるようにすると確認しやすい。)
4. 冷却用クラッシュアイス箱の氷にチューブを埋め、氷を密着させる。
(チューブはふたが氷から少し出る位まで深く埋める。)
5. 発泡スチロール箱の蓋を閉め、90分静置。

＜二次冷却＞

1. 一次冷却終了後、組織入りクライオチューブをフリーズボックスに移す。
2. 直ちに超低温フリーザー（-80℃）に入れる。
(フリーズボックスはフリーザー内の底面に直接置く。)
※組織入りクライオチューブの温度変化を最小にするよう、手早く作業する。
※この時、組織入りクライオチューブは蓋を持ち、保存溶液が入っている部分は絶対に触らない。
3. 超低温フリーザー（-80℃）内で3時間静置。
(ここでの静置時間は30分程度延長しても保存には問題ない。3時間以内にはしない。)
※この間フリーザーの扉開閉を繰り返さないようにする。

＜保管＞

1. 二次冷却終了後、組織入りクライオチューブをケーンに取り付け、直ちに液体窒素凍結保存容器に入れる。
※この時、組織入りクライオチューブは蓋を持ち、保存溶液が入っている部分は絶対に触らない。

＜解凍＞

1. 液体窒素保管容器から凍結神経細胞を取り出す。
2. 室温で30分間解凍する。この時間が短いと細胞が十分に解凍されない。
3. クライオチューブから保存溶液を0.8 mL取り除く。

4. 洗浄溶液（ライボビッツ L-15 培地もしくはHBSS(+)）をクライオチューブに1 mL加え、15 mL遠沈管に組織片とともに静かに移す。
5. 先ほどの15 mL遠沈管にさらに4 mLの洗浄溶液を加える。
6. 室温で5分間静置し、300 rpm、1分間、室温で遠心する。
7. 上澄みを除き、洗浄溶液を5 mL加える。
8. 室温で5分間静置し、300 rpm、1分間、室温で遠心する。
9. 神経細胞用分散液にて分散後、神経細胞用培地を用いて培養する。

【貯 法】

-80℃保存
凍結融解は繰り返さないでください。

【関連製品】

Code No.	品 名
291-78001	神経細胞用分散液
297-78101	神経細胞用分散液 S
148-09671	神経細胞用培地
128-06075	ライボビッツ L-15培地 (L-グルタミン、フェノールレッド、ビルビン酸ナトリウム含有)
082-09365	HBSS(+) (フェノールレッド含有)

製造発売元

富士フイルム 和光純薬株式会社
大阪市中央区道修町三丁目1番2号
Tel : 06-6203-3741