



Protocol: การเตรียมและการทำไว้เชื้อของ D-PBSA (Preparation and Sterilization of D-PBSA)

อุปกรณ์และสารเคมี

- |  |                        |
|--|------------------------|
| 1. KCl   | 200 มิลลิกรัมต่อลิตร   |
| 2. $\text{KH}_2\text{PO}_4$                            | 200 มิลลิกรัมต่อลิตร   |
| 3. NaCl  | 8,000 มิลลิกรัมต่อลิตร |
| 4. $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 2,160 มิลลิกรัมต่อลิตร |
| 5. น้ำ Ultrapure                                       | 1 ลิตร                 |
| 6. ภาชนะบรรจุสารละลายขนาด                              | 1 ลิตร                 |
| 7. แท่งแม่เหล็กคนสาร                                   |                        |
| 8. เครื่องวัดค่าการนำไฟฟ้า                             |                        |
| 9. เครื่องวัดความเป็นกรด-เบส                           |                        |
| 10. Autoclave tape หรือ Sterile-indicating tape        |                        |
| 11. เครื่อง Autoclave                                  |                        |

วิธีการ

1. ทำการเติม 800-900 มิลลิลิตร ของน้ำ Ultrapure ลงในบีกเกอร์ ขนาด 1,000 มิลลิลิตร
2. ใส่แท่งแม่เหล็กคนสารแล้วปรับให้หมุนที่ 200 rpm
3. เติมสารที่เป็นองค์ประกอบของ D-PBSA ตามที่ต้องการจนครบ
4. ทำการคนจนสารละลายหมด จากนั้นปรับปริมาตรให้เป็น 1,000 มิลลิลิตร
5. ทำการตรวจสอบค่า pH
  - 5.1 pH ควรมีค่าเท่ากับ  $7.4 \pm 0.1$
  - 5.2 สำหรับค่าการนำไฟฟ้าต้องไม่มากเกินไปร้อยละ 5 ของค่า  $150 \mu\text{Scm}^{-1}$
6. ภายหลังปรับ pH บรรจุ D-PBSA (non-sterile) ลงสู่ภาชนะเก็บ ปิดฝาแล้วมึนีกด้วย Autoclave tape หรือ Sterile-indicating tape
7. นำไปอบไอน้ำฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ  $121^\circ\text{C}$  เป็นเวลา 20 นาที ความดัน 100 kPa
8. หลังการฆ่าเชื้อ นำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

## Protocol: การทำความสะอาดและการทำซ้ำเชื้อเครื่องแก้ว (Washing of Glassware)

### ข้อควรระวัง

1. หลังจากการใช้เครื่องแก้ว จะมีการปนเปื้อนด้วยสารเคมี ไม่ควรปล่อยให้เครื่องแก้วแห้ง ควรนำไปแช่ในน้ำยาล้างเครื่องแก้ว (Detergent เช่น Virkon หรือ Decon) ที่มีส่วนผสมของน้ำยาฆ่าเชื้อ (Hypochlorite, 300 ppm available chloride, minimum, เมื่อเจือจางในน้ำยาล้างเครื่องแก้ว

1.1 น้ำยาล้างเครื่องแก้ว Virkon 50 กรัมในน้ำ 10 ลิตร คิดเป็นความเข้มข้น 0.5 %w/v

1.2 น้ำยาล้างเครื่องแก้ว Decon ใช้ปริมาณ 2-5 %v/v ผสมลงในน้ำสะอาด

1.3 น้ำยาฆ่าเชื้อ Hypochlorite 25 มิลลิลิตรต่อน้ำ 1 ลิตร

2. เครื่องแก้วที่ทำการฆ่าเชื้อแล้วควรที่จะใช้งานภายใน 2 วัน เพื่อให้แน่ใจว่าจะไม่มีการปนเปื้อนของเชื้อโรค

### วิธีการ

1. แช่เครื่องแก้ว 1 คืนในน้ำยาล้างเครื่องแก้วหรือแช่ไว้อย่างน้อย 2 ชั่วโมง

2. หลังจากผ่านการแช่ด้วยน้ำยาล้างเครื่องแก้ว นำไปล้างด้วยน้ำสะอาด 4 ครั้ง

3. ล้างด้วยน้ำปราศจากไอออน (Deionize) จำนวน 3 ครั้ง

4. นำเข้าตู้อบ โดยการวางคว่ำ ตั้งอุณหภูมิของ Hot air oven ที่ 60 °C ทำการอบจนเครื่องแก้วแห้ง

5. สำหรับเครื่องแก้วที่มีฝาปิด เมื่อเย็นให้ทำการปิดฝาเครื่องแก้วด้วย Aluminum Foil Sterilization โดยวิธี Dry Heat เครื่องแก้ว

1. ก่อนนำเครื่องแก้วเข้าตู้อบเพื่อฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิสูง สำหรับเครื่องแก้วที่มีฝาปิดเป็นพลาสติกจะต้องแยกฝาพลาสติกนั้นไปทำการฆ่าเชื้อโดยการ Autoclave

2. ทำการติดขวดแก้วด้วย Temperature indicators เช่น sterilize-indicating tapes

3. นำเครื่องแก้วเข้าตู้อบ การวางเครื่องแก้วควรเว้นระยะห่างระหว่างกันเพื่อให้ลมร้อนจากเครื่องกระจายได้ทั่วถึง

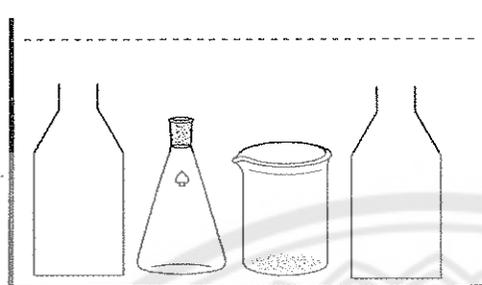
4. ปิดฝาตู้อบฆ่าเชื้อ

5. ตั้งเวลาและอุณหภูมิ ใช้ระยะเวลาในการอบ 30 นาทีที่อุณหภูมิ 160 °C ทั้งนี้ไม่รวมระยะเวลาที่ใช้ในการเพิ่มอุณหภูมิและลดอุณหภูมิของเครื่องอบฆ่าเชื้อ ซึ่งตั้งเวลาไว้ที่ 3 ชั่วโมง เครื่องจะทำการปิดอัตโนมัติ

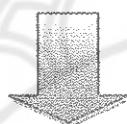
6. เก็บเครื่องแก้วที่ทำการฆ่าเชื้อหลังจากปล่อยให้เครื่องอบมีอุณหภูมิลดลง อย่าเปิดฝาในทันทีหลังจากตู้อบหยุดทำงาน โดยปกติจะปล่อยให้เครื่องลดอุณหภูมิข้ามคืน และทำการเก็บเครื่องแก้วในเช้าวันถัดไป



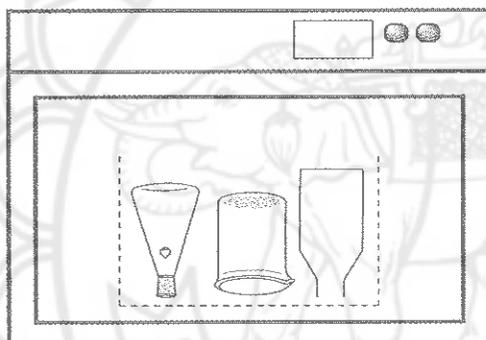
## Washing and Sterilizing Glassware



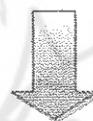
แช่เครื่องแก้วค้างคืนด้วยน้ำยาล้าง  
เครื่องแก้ว เช่น Virkon หรือ Decon  
ที่มีส่วนผสมของน้ำยาฆ่าเชื้อ เช่น  
Hypochlorite



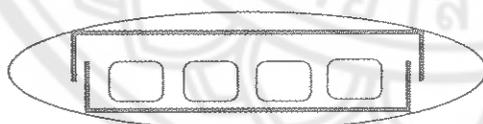
- ล้างผ่านด้ายน้ำสะอาด 4 ครั้ง
- ตามด้วยการล้างผ่านด้วยน้ำปราศจากไอออน 3 ครั้ง



อบให้แห้งที่ 60 °C เป็นเวลา 7 ชั่วโมง



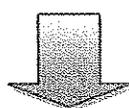
ปิดฝาขวดด้วย  
Aluminum Foil



นำฝาที่ผ่านการล้างบรรจุลง Petri  
Dish แล้วห่อด้วย Steam-permeable  
nylon film และ Autoclave tape



Dry heat  
160 °C / L 3 ชั่วโมง



Autoclave

1 bar, 121 °C, 20 นาที

ภาพ 34 ขั้นตอนการ subculture เซลล์ BALB/3T3 โคลน A31

## Protocol: การทำความสะอาดและการทำให้เชื้อปิเปตต์แก้ว (Washing and sterilization of Glass pipettes)

### ข้อควรระวัง

1. หลังการใช้ปิเปตต์แก้วจะมีการปนเปื้อนด้วยสารเคมี ไม่ควรปล่อยให้ปิเปตต์แก้วแห้ง ควรนำไปแช่ใน น้ำยาล้างเครื่องแก้ว (Detergent เช่น Virkon หรือ Decon) ที่มีส่วนผสมของน้ำยาฆ่าเชื้อ (Hypochlorite, 300 ppm available chloride, minimum)

1.1 น้ำยาล้างเครื่องแก้ว Virkon 50 กรัมในน้ำ 10 ลิตร คิดเป็นความเข้มข้น 0.5 %w/v

1.2 น้ำยาล้างเครื่องแก้ว Decon ใช้ปริมาณ 2-5 %v/v ผสมลงในน้ำสะอาด

1.3 น้ำยาฆ่าเชื้อ Hypochlorite 25 มิลลิลิตรต่อน้ำ 1 ลิตร

2. ปิเปตต์แก้วที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วควรที่จะใช้งานภายใน 2 วัน เพื่อให้แน่ใจว่าจะไม่มีการปนเปื้อนจากเชื้อจุลินทรีย์หรือสิ่งสกปรกอื่นๆ และในกรณีที่ยังไม่มีการใช้ปิเปตต์ที่บรรจุอยู่ในกล่องควรพันรอบปากกล่องด้วยเทปขาว (Adhesive tapes)

3. สำหรับเครื่องล้างปิเปตต์อัตโนมัติ เมื่อทำการปรับ mode ตั้งเวลาการล้าง ไม่ควรปรับหรือหมุนตัวตั้งเวลาการทำงานของเครื่องกลับก่อนเวลาหยุดการทำงาน ควรให้เครื่องหยุดทำงานเอง ยกเว้นการปรับ infinity mode สามารถหยุดการทำงานเมื่อต้องการได้ตลอดเวลา

4. สิ่งที่ต้องระวัง คือ การใช้ sterilize taps ผิดประเภท เช่น การนำ autoclave taps ที่ใช้สำหรับล้างฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำที่อุณหภูมิสูงภายใต้ความดัน มาใช้ในงานอบแห้งที่อุณหภูมิสูงจะมีผลให้เกิดผงเขม่าสีดำภายในตู้อบ ดังนั้นจึงควรเลือกใช้ sterilize-indicating tapes ให้เหมาะสมกับงาน

### วิธีการ

1. แช่ปิเปตต์ 1 คืนหรืออย่างน้อย 2 ชั่วโมง ในน้ำยาล้างเครื่องแก้วซึ่งมีส่วนผสมของน้ำยาฆ่าเชื้อ

2. หลังจากผ่านการแช่ในน้ำยาล้างเครื่องแก้ว ทำการย้ายปิเปตต์เข้าสู่เครื่องล้างปิเปตต์ (pipette washer)

3. ล้างผ่านด้วยน้ำสะอาดอย่างน้อย 3 ชั่วโมง

4. ย้ายปิเปตต์ลงในสารละลายเจือจางของ acetic acid หรือ hydrochloric 25-30 มิลลิลิตรในน้ำสะอาดซึ่งบรรจุใน pipette cylinder คิดเป็นปริมาตรร้อยละ 80 ของปริมาตรทั้งหมด เป็นเวลา 30 นาที

5. ล้างผ่านด้วยน้ำสะอาดอย่างน้อย 4 ชั่วโมง

6. ล้างด้วยน้ำปราศจากไอออน 3 ครั้ง

7. ย้ายปิเปตต์เข้าสู่ตู้อบแห้ง (drying oven) ที่อุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลา 7 ชั่วโมง

8. เมื่อปิเปตต์แห้งทำการนำปิเปตต์ไปอุดสำลี

9. แยกประเภทของปิเปตต์ที่ได้ทำการอุดสำลีตามขนาดลงสู่กล่องใส่ปิเปตต์ (pipette cans) ขนาดบรรจุ 1/2-2/3 ของปริมาตรของกล่อง

10. ปิดฝากล่องใส่ปิเปตต์ด้วยฝาปิด (pipette caps)

11. ติด Sterilize-indicating tapes บริเวณรอยต่อระหว่าง pipette cans กับ pipette caps

Sterilization โดยวิธี Dry Heat

1. นำเครื่องแก้วเข้าสู่ตู้อบ

2. การวางกล่องใส่ปิเปตต์ (pipette cans) ควรเว้นระยะห่างระหว่างกันเพื่อให้ลมร้อนจากเครื่องกระจายได้ทั่วถึง

3. ปิดฝาทู้อบฆ่าเชื้อ

4. ใช้ระยะเวลาในการอบ 30 นาทีที่อุณหภูมิ 160 °C ทั้งนี้ไม่รวมระยะเวลาที่ใช้ในการเพิ่มอุณหภูมิและลดอุณหภูมิของเครื่องอบฆ่าเชื้อ ซึ่งตั้งเวลาไว้ที่ 3 ชั่วโมง จากนั้นเครื่องจะหยุดทำงานอัตโนมัติ

5. เก็บกล่องใส่ปิเปตต์ (pipette cans) ที่ทำการฆ่าเชื้อ หลังจากปล่อยให้เครื่องอบมีอุณหภูมิลดลง อย่าเปิดตู้อบในทันทีหลังจากตู้อบหยุดทำงาน โดยปกติจะปล่อยให้เครื่องลดอุณหภูมิจนถึงอุณหภูมิต่ำจึงทำการเก็บออกจากเครื่องอบฆ่าเชื้อ

## Protocol: Subculture of monolayer cells for BALB/3T3 โคลน A31

### Material

1. Dulbecco's modification of Eagle's medium + ร้อยละ 10 ของ NBCS (DMEM complete medium)
2. 0.25 %w/v trypsin- 0.53 มิลลิโมลาร์ EDTA solution
3. Phosphate buffer saline
4. Multiwell plate หรือ Petri dishes หรือ Flasks หรือ Stirrer bottles (ขึ้นกับชนิดของงาน)
5. Graduated ปิเปตต์ ขนาด 1 มิลลิลิตร, 5 มิลลิลิตร, 10 มิลลิลิตร และ 25 มิลลิลิตร
6. อื่นๆ

### วิธีการ

เตรียมสารและอุปกรณ์ที่มีความจำเป็นเข้าสู่ Laminar flow hood ตรวจสอบความหนาแน่นของเซลล์ว่าพร้อมที่จะทำการ subculture ได้หรือไม่ ถ้าสามารถทำการ subculture ได้แล้วจึงปฏิบัติตามขั้นตอนดังต่อไปนี้

1. นำ Multiwell plate หรือ Petri dishes หรือ Flasks หรือ Stirrer bottles เข้าสู่ Laminar flow hood
2. ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออกโดยให้เหลือปกคลุมอยู่เหนือเซลล์เพียงเล็กน้อย
3. ล้างด้วยสารละลาย DPBS 1-2 ครั้ง เพื่อล้างเอาสารที่เป็น trypsin inhibitor ในอาหารเลี้ยงเซลล์ออก โดยใช้ปริมาณเป็นครึ่งหนึ่งของอาหารที่ใช้
4. เติม 0.25 %w/v trypsin- 0.53 มิลลิโมลาร์ EDTA solution (incubate ไว้ประมาณ 5 นาที หรือจับเวลาและดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ทุกๆ 1 นาที )
5. ตรวจสอบการแยกของเซลล์ออกเป็นเซลล์เดี่ยวๆ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์
6. นำไปปั่นเหวี่ยง หลังการปั่นเหวี่ยง ดูด supernatant ทิ้งเหลือไว้แต่ pellet
7. ใช้ ปิเปตต์ ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ 5 มิลลิลิตร ใส่ใน centrifuge tube แล้วดูชั้นลงเพื่อให้เซลล์เกิดการกระจายตัว

8. แบ่งเซลล์ส่วนหนึ่งเพื่อนำไปนับจำนวนด้วยเครื่อง Hemocytometer เซลล์อีกส่วนหนึ่งนำไปใส่ใน Multiwell plate หรือ Petri dishes หรือ Flasks หรือ Stirrer bottles ตามความเหมาะสมของผู้ทำการทดลอง

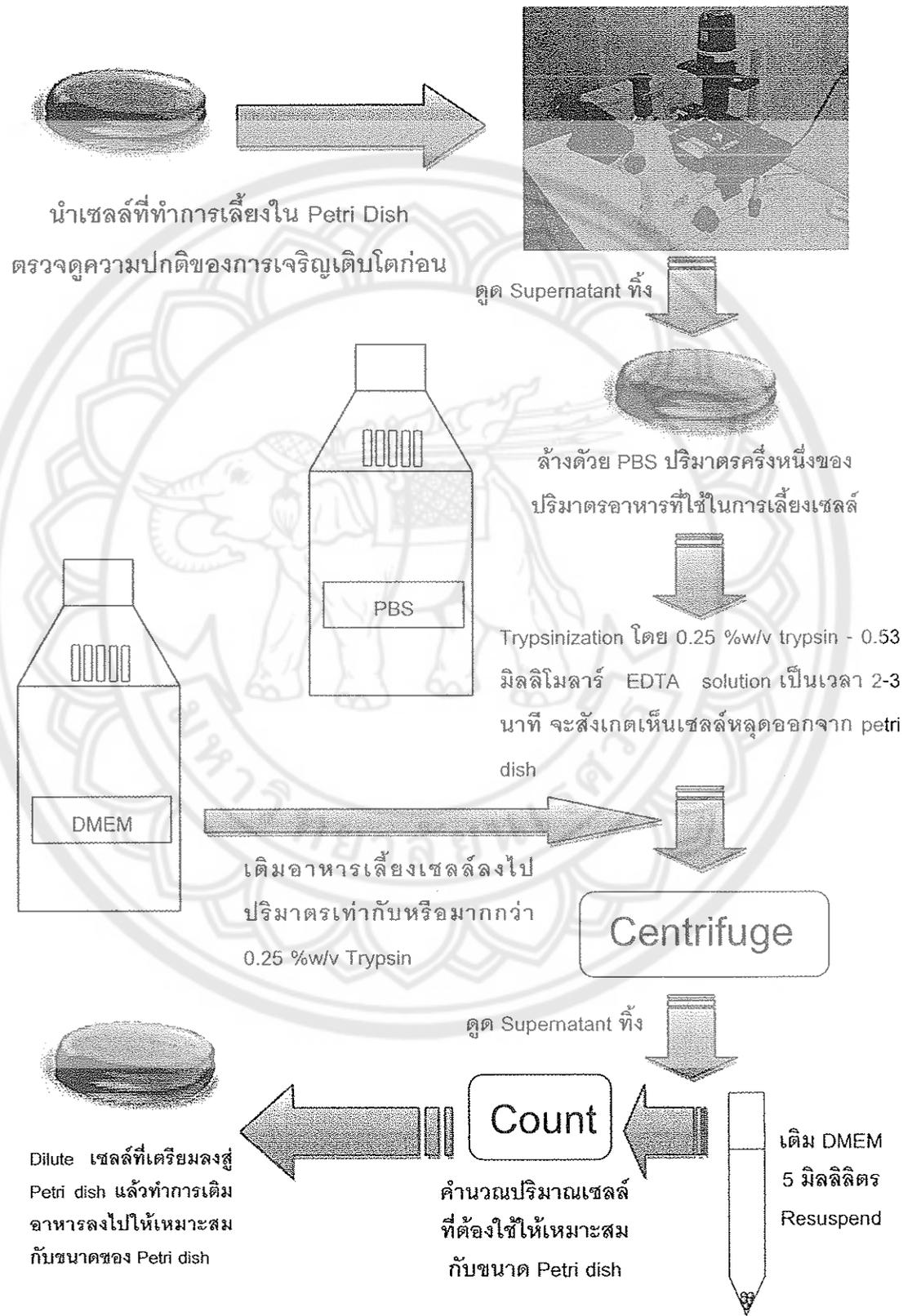
9. สำหรับเซลล์ที่นำไปนับใช้ pipette ขนาด 100 ไมโครลิตร ผสมกับร้อยละ 0.4 trypan blue ใน PBS 100 ไมโครลิตร แล้ว mixed ให้เข้ากัน

10. ใช้ไมโคร pipette ดูดมา 12 ไมโครลิตร แล้ว load ลง Hemocytometer cell count คำนวณหาจำนวนเซลล์ทั้งหมดใน Plate และคำนวณเพื่อหาจำนวนเซลล์ที่จะได้ในภาชนะที่ต่อการตามขนาดพื้นที่ Plate

11. เมื่อคำนวณจำนวนเซลล์ต่อขนาดภาชนะแล้ว เติมหอาหารตามความเหมาะสมกับขนาดของภาชนะเลี้ยงซึ่งมีการระบุนำไปใช้ต่อปริมาณเซลล์ นำไป incubate ที่ 37 °C (Atmosphere: air ร้อยละ 95 ; CO<sub>2</sub> ร้อยละ 5)

Subcultivation ratio: สำหรับ plate ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 60.00 มิลลิเมตร 3 x 10<sup>5</sup> เซลล์ต่อ 1 plate ทำการ subculture ทุกๆ 2-3 วัน โดย subculture 3 ครั้งต่อสัปดาห์

### Trypsinization



ภาพ 35 ขั้นตอนการ thawing Frozen Cells

## Protocol: Thawing Frozen Cells

### Material

1. Culture flask
2. Centrifuge tube
3. Growth medium
4. ปิเปตต์ขนาด 1 มิลลิลิตร และ 10 มิลลิลิตร
5. Syringe

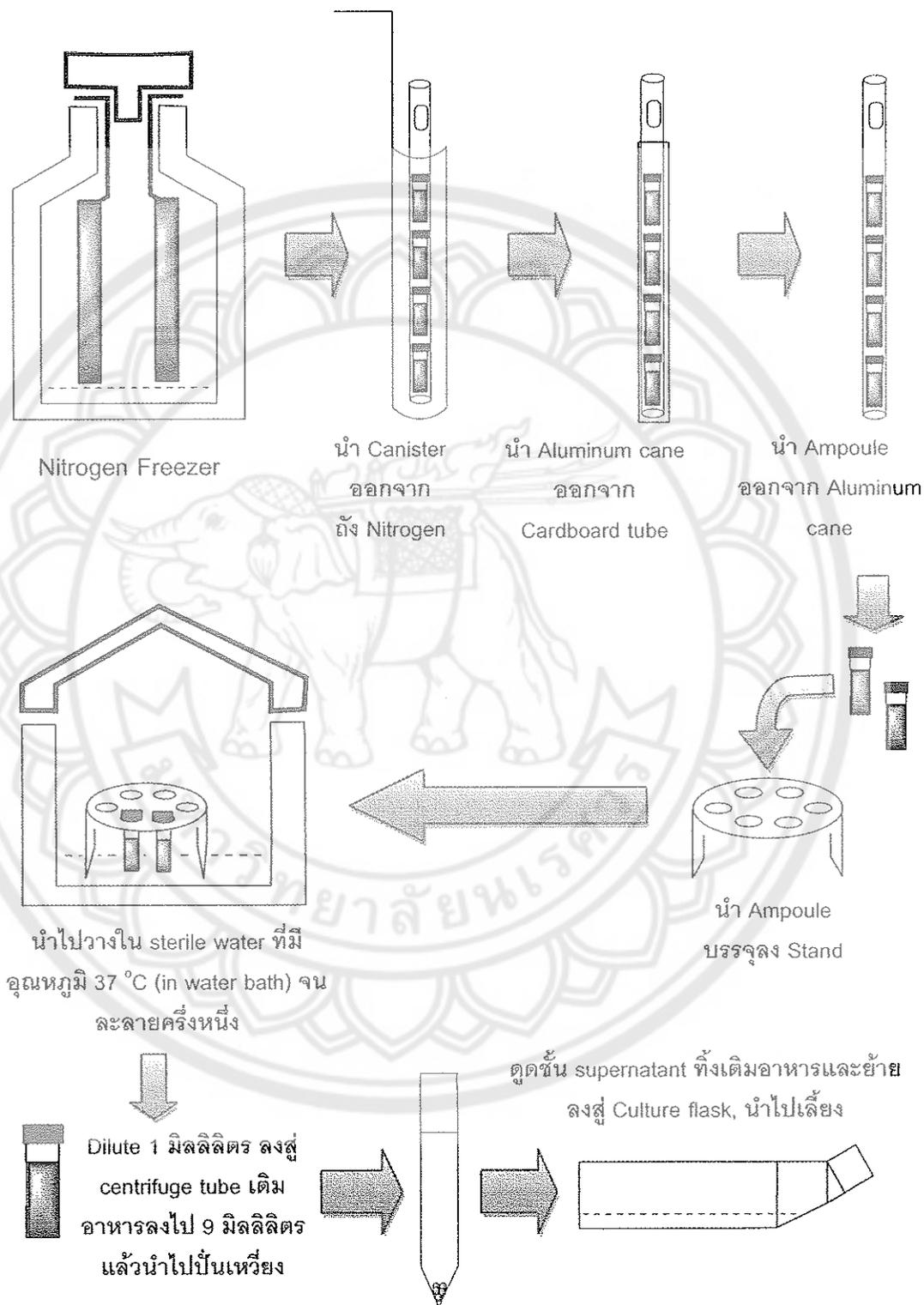
### Nonsterile

1. Protective gloves and face mask
2. Sterile water at 37 °C ความสูงของระดับน้ำใน water bath 10 เซนติเมตร
3. Trypan Blue ร้อยละ 0.4

### วิธีการ

1. เตรียมอุปกรณ์, อาหารเลี้ยงเซลล์, และทำการ label ในส่วนของ culture flask ที่ทำการเตรียมไว้
2. นำส่วนของ ampoule ที่ได้ทำการแช่แข็งเซลล์ ตรวจสอบข้อมูลที่จดไว้บน ampoule อีกครั้งหนึ่งเพื่อความถูกต้องของเซลล์ที่ต้องการ thawing
3. นำไปวางใน water bath ที่มีอุณหภูมิ 37 °C หากเป็นไปได้ในขณะที่นำ ampoule วางลงใน water bath โดยให้ระดับน้ำสูงครึ่งหนึ่งของหลอด ไม่ควรให้ส่วนผาจมลงในน้ำ เพื่อป้องกันการปนเปื้อน
4. เมื่อภายใน ampoule ละลาย ทำการตรวจสอบสิ่งที่ได้จดไว้บน ampoule ที่ thawed เพื่อยืนยันว่าเป็นเซลล์ที่ต้องการจริงๆ
5. ทำการย้ายเซลล์ที่อยู่ใน ampoule ลงสู่ centrifuge tube โดยใช้ ปิเปตต์ 1.00 มิลลิลิตร
6. เติมอาหารอย่างช้าๆ จำนวน 10 มิลลิลิตร ใช้เวลามากกว่า 2 นาที ซึ่งเซลล์ในขั้นตอนนี้จะมีลักษณะแขวนลอย
  - 6.1 ละลายเซลล์อย่างช้าๆ กับอาหารเลี้ยงเซลล์ resuspend 6 ครั้ง ใน centrifuge tube
  - 6.2 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 100 rpm เป็นเวลา 2 นาที
  - 6.3 ดูดชั้น supernatant ทิ้ง (เป็นการล้างเอาส่วนของ cryoprotectant ออกจากเซลล์)
  - 6.4 นำเซลล์ส่วนที่แยกได้ดังกล่าวไปทำการเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์
7. 1 วันต่อมาสังเกตการเกาะและการแผ่ของเซลล์

### Thawing Frozen Cells



ภาพ 36 ขั้นตอนการ thawing Frozen Cells

ตาราง 7 จำนวนเซลล์ที่เหมาะสมในการ subculture ลงสู่ภาชนะเลี้ยงเซลล์ชนิดต่างๆ

Culture Vessel	Replicates	ml	cm <sup>2</sup>	Approximate Cell yield (HeLa)
Multiwell plate				
Microtitration	96	0.1	0.3	$1 \times 10^5$
Microtitration	144	0.1	0.3	$1 \times 10^5$
4- well plate	4	2	2	$5 \times 10^5$
6- well plate	6	2	10	$2 \times 10^6$
12- well plate	12	1	3	$7.5 \times 10^5$
24- well plate	24	1	2	$5 \times 10^5$
Petri dishes				
3.5-cm diameter	1	2	8	$2 \times 10^6$
5-cm diameter	1	4	17.5	$4 \times 10^6$
6-cm diameter	1	5	21	$5 \times 10^6$
9-cm diameter	1	10	49	$1 \times 10^7$
Flasks				
10	1	2	10	$2 \times 10^6$
25	1	5	25	$5 \times 10^6$
75	1	25	75	$2 \times 10^7$
175	1	75	175	$5 \times 10^7$
225	1	100	225	$6 \times 10^7$
Roller bottle	1	200	850	$2.5 \times 10^8$
Stirrer bottles				
500 ml	1	50		$5 \times 10^7$
(unsparged)	1	4,000		$4 \times 10^9$
5000 ml (sparged)				

## Protocol: Freezing Cells

### Material

1. เซลล์ที่ต้องการทำการแช่แข็ง
2. Dulbecco's modification of Eagle's medium + ร้อยละ 50 ของ NBCS (DMEM complete medium for freezing)
3. 0.25 %w/v trypsin- 0.53 มิลลิโมลาร์ EDTA solution
4. Phosphate buffer saline
5. Multiwell plate หรือ Petri dishes หรือ Flasks หรือ Stirrer bottles (ขึ้นกับชนิดของงาน)
6. Graduated ปิเปตต์ ขนาด 1 มิลลิลิตร, 5 มิลลิลิตร, 10 มิลลิลิตร, 25 มิลลิลิตร
7. Cryoprotectant (DMSO) ประกอบด้วย
  - 7.1 DMEM without calcium (invitrogen)
  - 7.2 ร้อยละ 20 DMSO
  - 7.3 ร้อยละ 20 FCS
8. Plastic ampoule ขนาด 1.2 มิลลิลิตร
9. Liquid Nitrogen Freezer

### วิธีการ

1. ทำการเตรียมอาหารแช่แข็ง ซึ่งในอาหารจะมีการเติม Cryoprotectant
2. เตรียมเซลล์ที่ต้องการแช่แข็ง ตรวจสอบดูความเรียบร้อยว่าใช่เซลล์ที่ต้องการ
3. นำเซลล์ที่ต้องการแช่แข็ง ซึ่งเลี้ยงไว้ใน Plate ไปทำการ Trypsinization
4. ส่วนหนึ่งของเซลล์ ทำการนับจำนวนเซลล์ทั้งหมดที่ได้จากการเลี้ยง
5. Dilute Cells จากการคำนวณปริมาณเซลล์ทั้งหมดที่ทำกรนับได้ต่อจำนวนเซลล์ที่ต้องการบรรจุลงใน Ampoule โดยใช้ Plastic ampoule ขนาด 1.2 มิลลิลิตร ( $2 \times 10^6$ - $2 \times 10^7$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร)

6. จากนั้นใช้อัตราส่วนของเซลล์ที่เตรียมไว้ต่ออาหารแช่แข็งเป็นอัตราส่วน 1:1 ซึ่งผลก็คือปริมาณเซลล์ที่ได้สุดท้ายใน Ampoule ประมาณ  $1 \times 10^6$ - $1 \times 10^7$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร และความเข้มข้นของ DMSO จะอยู่ที่ร้อยละ 10

7. Resuspense เซลล์ใน Ampoule ด้วย ปิเปตต์ ให้เซลล์เกิดการกระจายอย่างทั่ว

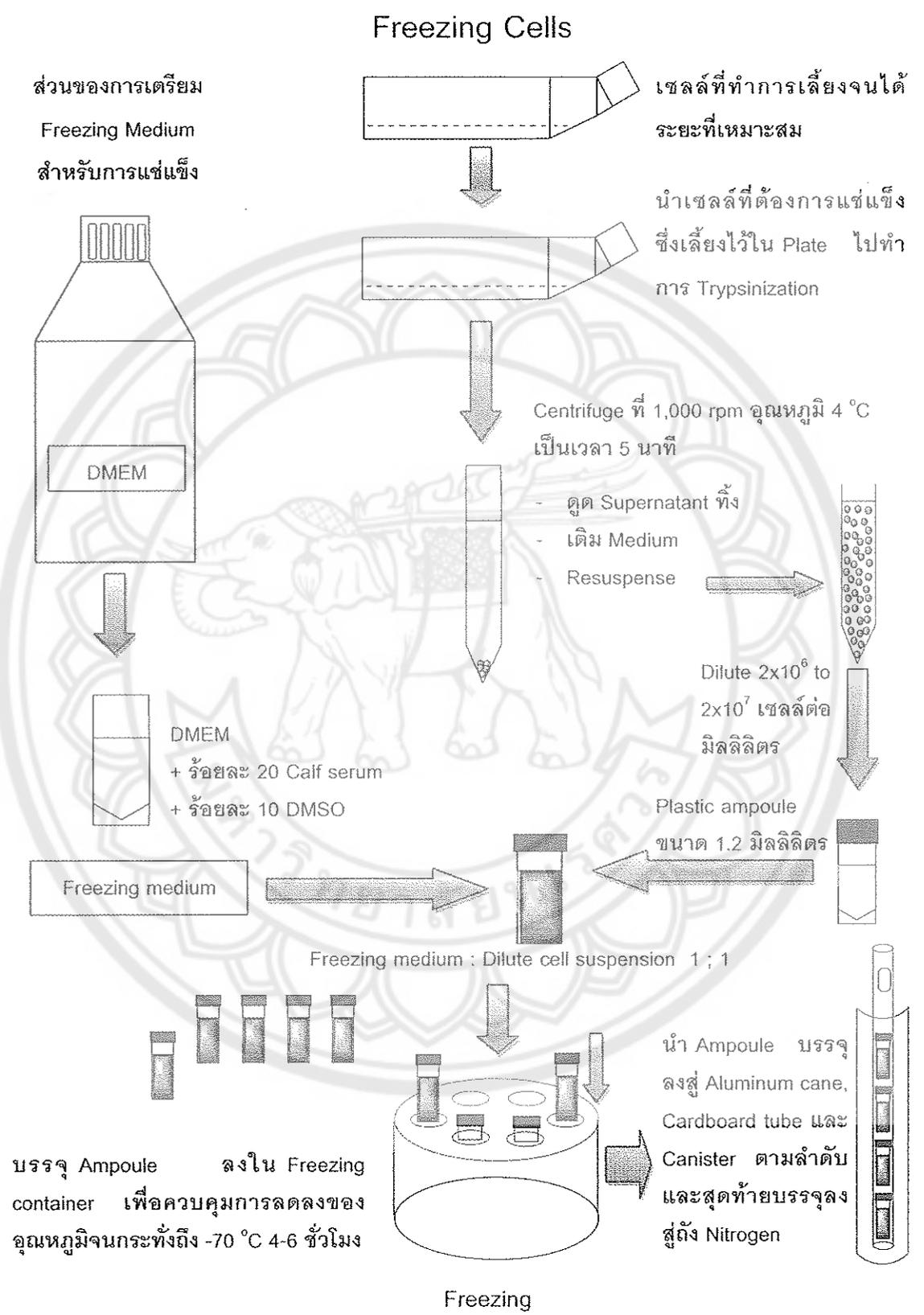
8. ปิดฝา Ampoule

9. นำ Ampoule ที่บรรจุเซลล์ที่ต้องการนำไปแช่แข็งใส่ลงใน Freezing container เพื่อควบคุมการลดลงของอุณหภูมิจนกระทั่งถึง  $-70^\circ\text{C}$  (อัตราการลดลงของอุณหภูมิภายใน Freezing container เป็น  $1^\circ\text{C}$  ต่อนาที)

10. เช็คความเรียบร้อยของสิ่งที่ทำกรจดบันทึกไว้บน Ampoule อีกครั้ง

11. การแช่แข็งช่วงแรกเพื่อให้อุณหภูมิลดลงจนถึง  $-70^\circ\text{C}$  ใช้เวลาอย่างน้อย 4-5 ชั่วโมง หรือ ค้างคืนก่อนนำไปเก็บในถังไนโตรเจนเหลว

12. ย้าย ampoule ลงสู่ถังไนโตรเจนเหลว



ภาพ 37 ขั้นตอนการเก็บรักษาเซลล์โดยการแช่แข็ง