

# Sicherheits- und Handhabungshinweise CryoPure

## Sicherheitshinweis

Aus Sicherheitsgründen sollten CryoPure Röhren immer in der Gasphase gelagert werden. Während des Einfrierprozesses bildet sich innerhalb der Gefäße ein Vakuum, dessen Größe abhängig von der Füllmenge (Einfriermenge) ist. Werden die CryoPure Röhren in flüssigem Stickstoff aufbewahrt, kann flüssiger Stickstoff in Abhängigkeit vom gebildeten Vakuum in die Röhren eindringen. Bei der Entnahme bzw. bei dem Auftauprozess der Röhren geht der flüssige Stickstoff in die Gasphase über und führt zum Aufbau eines Innendruckes. Dieser kann zur Folge haben, dass infektiöses Material aus den Röhren entweicht oder Röhren explodieren. Beim Eindringen von Stickstoff in die Gefäße kann es zudem auch zur Kontamination des Probengutes durch verunreinigten Stickstoff kommen.

Beim Umgang mit CryoPure Röhren sollten immer die üblichen Sicherheitsmaßnahmen eingehalten werden:

- Röhren nur in der Gasphase lagern.
- Gefäße bis zur Nennmarkierung füllen.
- Röhren handfest zudrehen, nicht überdrehen, keine Hilfsmittel benutzen.
- Schutzkleidung, Gesichtsschutz, Schutzbrille und Handschuhe benutzen.
- Gefäße beim Auftauen in Behälter (z.B. Wasserbad) legen und abdecken.

*Bitte beachten Sie auch Ihre laborinternen Sicherheitsvorschriften!*

## Standardprotokoll zum Einfrieren von Säugerzellen

- Waschen der Zellen mit PBS.
- Ablösen der Zellen in Abhängigkeit vom Zelltyp mit geeigneter Methode (z.B. Behandlung des Zellrasens mit EDTA-, Trypsin- oder EDTA-Trypsin-Lösung).
- Stoppen der Reaktion mit serumhaltigem Zellkulturmedium.
- Feststellung der Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer.
- Zentrifugation der Zellen (5 min, 350 x g, RT), Überstand verwerfen.
- Resuspension des Zellpellets in serumhaltigem Kulturmedium, Einstellung der Zellzahl auf ca.  $10^7$  Zellen/ml.
- Zugabe von 1 Volumen 2-fach konzentriertem Einfriermedium (z.B. 50% Medium, 30% FCS, 20% DMSO); die Zellzahl sollte ca.  $5 \times 10^6$  Zellen/ml betragen.
- Befüllen der CryoPure Röhren bis zur angegebenen Nennmarkierung.
- Einfrieren der Proben in einem isolierenden Behälter bei  $-80^\circ\text{C}$ , in dem die Abkühlrate von ca.  $1^\circ\text{C}/\text{min}$  gewährleistet ist. Die Lagerung der Zellen bei  $-80^\circ\text{C}$  sollte mindestens 6 h erfolgen, je nach Zelltyp können Zellen auch bis zu mehreren Tagen bei  $-80^\circ\text{C}$  lebensfähig gehalten werden.
- Überführen der Röhren in den Stickstofftank.

## Standardprotokoll zum Auftauen

- Die CryoPure Röhren werden aus dem Stickstoffbehälter schnell in ein  $37^\circ\text{C}$ -Wasserbad gegeben und abgedeckt.
- Nach dem Auftauen werden die Röhren kurz mit 70%igem Alkohol desinfiziert, abgetrocknet, und die Zellsuspension wird in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen (z.B. REF 62.554.002) überführt.
- Zugabe von Kulturmedium und Zentrifugation der Zellen (5 min, 350 x g, RT).
- Verwerfen des Überstandes und Resuspension der Zellen in einer geeigneten Menge frischen Zellkulturmediums.
- Befüllung einer Zellkulturflasche und Inkubation.

# Safety Instructions and User Guide CryoPure

## Caution

For safety reasons, CryoPure tubes must always be stored in the gas phase of liquid nitrogen. During the freezing process, a vacuum is created inside the tubes. The size of the vacuum is dependent upon the filling volume (freezing volume). When CryoPure tubes are stored in liquid nitrogen, liquid nitrogen may enter the tubes in proportion to the vacuum inside. During removal and/or thawing of the tubes the liquid nitrogen changes into the gas phase and causes an internal pressure to build. As a result, infectious material may be released or the tubes may explode. Contaminated nitrogen entering the tubes may also harm the cellular components of the sample.

Always observe appropriate safety precautions when working with CryoPure tubes:

- Store tubes in the gas phase only.
- Fill the tubes to the fill mark.
- Apply screw cap handtight. Do not over-tighten or use any tool.
- Wear protective clothing, face protection, glasses and gloves.
- Place tubes into a container (e.g. water bath) with cover during the thawing process.

*Please also observe your institutional safety guidelines!*

## Standard Protocol for Freezing Mammalian Cells

- Rinse cells with PBS.
- Remove cells with suitable method depending on the cell type (e.g. treatment of cell layer with EDTA-, Trypsin- or EDTA-Trypsin solution).
- Stop reaction with cell culture medium containing serum.
- Count cells by means of Neubauer cell chamber.
- Centrifuge cells (5 min, 350 x g, room temperature), discard supernatant.
- Re-suspend the cell pellet in a culture medium containing serum in order to render a final cell concentration of approx.  $10^7$  cells/ml.
- Add 1 volume of double-concentrated freezing medium (e.g. 50% medium, 30% FCS, 20% DMSO). The number of cells should be at least about  $5 \times 10^6$  cells/ml.
- Fill CryoPure tubes to fill mark.
- Freeze samples in an insulating container at  $-80^{\circ}\text{C}$  that ensures a cooling rate of  $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ . Cells should be stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  for at least 6 hours. Depending on the cell type, cells may also be viable for several days at  $-80^{\circ}\text{C}$ .
- Transfer the tubes to a liquid nitrogen tank.

## Standard Thawing Protocol

- Quickly remove the CryoPure tubes from the liquid nitrogen freezer and place into a  $37^{\circ}\text{C}$  water bath with cover.
- After thawing, briefly disinfect the tubes with 70% alcohol. Dry and transfer the cell suspension into a 15 ml centrifuge tube (e.g. REF 62.554.002).
- Add culture medium and centrifuge cells (350 x g at room temperature for 5 minutes).
- Discard the supernatant and re-suspend cells in a suitable fresh culture medium.
- Transfer to a cell culture vessel and incubate.