

Jan 24, 2025

Congelación de células

DOI

<https://dx.doi.org/10.17504/protocols.io.5qpvo92y7v4o/v1>



Judit Garcia¹

¹Universidad Católica San Antonio (UCAM)

UCAM HITECH



Judit Garcia

Universidad Católica San Antonio (UCAM)

Create & collaborate more with a free account

Edit and publish protocols, collaborate in communities, share insights through comments, and track progress with run records.

Create free account

OPEN  ACCESS



DOI: <https://dx.doi.org/10.17504/protocols.io.5qpvo92y7v4o/v1>

Protocol Citation: Judit Garcia 2025. Congelación de células. protocols.io
<https://dx.doi.org/10.17504/protocols.io.5qpvo92y7v4o/v1>



License: This is an open access protocol distributed under the terms of the **[Creative Commons Attribution License](#)**, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited

Protocol status: Working

We use this protocol and it's working

Created: January 20, 2025

Last Modified: January 24, 2025

Protocol Integer ID: 118740

Keywords: congelar célula, para preservarlas durante largo, congelación, congelación cuando el cultivo esté en fase logarítmica, tiempo manteniendo la viabilidad, crecimiento con una confluencia alrededor del, crecimiento

Abstract

Congelar células en crioviales para preservarlas durante largos periodos de tiempo manteniendo la viabilidad.

NOTA: Se puede proceder a la congelación cuando el cultivo esté en fase logarítmica de crecimiento con una confluencia alrededor del 80%.

Guidelines

Gestión de residuos:

	A	B	C	D
	Tipo de residuo	Envase	Etiqueta	Ejemplos
	Sólidos no punzantes (L.E.R. 180103)	Contenedor negro con etiqueta de residuo biológico (situado al lado de la campana).	Pictograma peligro biológico.	Frascos de cultivo. Pipetas serológicas y puntas. Pipetas de vidrio. Tubos. Cualquier material que haya entrado en contacto con restos no inactivados. Recipientes de los reactivos.
	Sólidos punzantes (L.E.R. 180103)	Contenedor amarillo.	Etiqueta en el envase.	Pipetas de vidrio.
	Líquidos → residuos sanitarios (L.E.R. 180103)	Podrán verterse al desagüe habiendo añadido previamente un 10% de lejía durante al menos 20 minutos.	Sin etiqueta.	Restos del aspirador en el matraz.

Materials

Materiales y equipamientos:

- Cabina de bioseguridad II
- Baño termostático
- Rollo de papel
- Frasco con células en cultivo adherente
- Aspirador con salida en un matraz erlenmeyer con lejía
- Puntas de vidrio para el aspirador
- Pipetas graduadas
- Auxiliar de pipeteo
- Tubos falcon de 15 mL
- Centrífuga
- Micropipeta
- Puntas de micropipeta
- Eppendorfs
- Cámara de Neubauer y cubreobjetos (conteo manual)
- Portaobjetos con pocillos para conteo (conteo con el contador automático)
- Crioviales
- Recipiente de congelación a temperatura ambiente
- Criotubos con 1 mL de agua (si se usa el recipiente de congelación CoolCell)

Reactivos:

- Etanol al 70% (preferiblemente en una botella tipo spray)
- PBS a 37°C (dejar en el baño termostático al menos 10 minutos)
- DMEM a 37°C (dejar en el baño termostático al menos 10 minutos)
- Tripsina (mejor no calentarla pierde efectividad)
- Azul de tripán
- DMSO
- FBS (opcional dependiendo del medio de congelación que quieras usar)
- Isopropanol (para el Mr. Frosty)

Safety warnings





Before start

EPIs y equipos de seguridad

- Bata (con puño preferiblemente)
- Guantes
- Manguitos
- Mascarilla (recomendable)
- Gafas de seguridad (recomendable)
- Cabina de seguridad biológica tipo II



- 1 Encender la cabina y poner la luz UV durante al menos 10 minutos.
- 2 Apagar la luz UV y desinfectar la cabina con etanol al 70%.
- 3 Introducir todo el material necesario en la cabina, desinfectándolo con etanol al 70%.
- 4 Retirar el medio del frasco mediante aspiración.
- 5 Pipetear 8 mL (frasco de 75) o 5 mL (frasco de 25) de PBS al frasco y posteriormente aspirar (para lavar el frasco).
- 6 Añadir 2 mL (frasco de 75) o 1 mL (frasco de 25) de tripsina y dejar reposar de 3 a 5 minutos en el incubador.  
- 7 Observar el frasco en el microscopio invertido para comprobar si las células se han despegado, si están adheridas se darán unos golpes al frasco por ambos laterales con la mano hasta que se despeguen, si ese método tampoco funciona habrá que dejar el frasco 1 minuto más en el incubador. Se repetirá este paso hasta que observemos las células en suspensión. 
- 8 Se añadirán 6 mL de medio con suero fetal bovino (o el suero que se tenga) por cada mililitro de tripsina que se haya añadido al frasco (12 mL en un frasco de 75 // 6 mL en un frasco de 25). Mezclar bien y transferirlo a un tubo Falcon de 15mL.
- 9 Centrifugar a 200 G, 20°C, durante 5 minutos (protocolo 1 en la centrífuga de cultivos celulares). 
- 9.1 RECUERDA: la centrífuga tiene que estar equilibrada para ello hay que enfrenar los tubos con el mismo peso.
- 10 Preparar el criovial rotulando lo siguiente: línea celular, nº de pase (el pase será el mismo del flask de partida), fecha, cantidad de células (cuando las contemos).
- 10.1 Dos medios de congelación recomendados:
 - Primero: 40% FBS (400µL) + 10% DMSO (100µL) + 50% Células con su medio de cultivo completo (500µL).
 - Segundo: 95% Células con su medio de cultivo completo (950µL) + 5% DMSO (50µL).

Volumen final del criovial será de 1mL.

- 10.2 Se puede preparar los crioviales rotulados con el medio de congelación en su interior, y dejarlo preparado para introducir las células después.
- 11 Tras la centrifugación se forma un pellet con las células. Llevar el tubo a la cabina y retirar todo el sobrenadante mediante aspiración (mucho cuidado de no aspirar las células).
- 12 Resuspender las células con 1 mL de medio completo (el volumen dependerá del pellet obtenido, + pellet + medio, - pellet - medio).
- 13 Preparar un tubo eppendorf con 10 μ L de azul de tripán y 10 μ L de la suspensión anterior, mezclar. Aspirar 10 μ L de la mezcla del tubo eppendorf y transferirlo a una cámara de Neubauer (o el recipiente contador correspondiente).
- 14 Una vez conocida la concentración de células viables realizar cálculos para congelar en cada criovial una cantidad de células entre 1M y 5M (dependiendo del medio de congelación que vayamos a usar recuerda que cogemos 500 μ L o 950 μ L).
- 15 Cuando se tiene el criovial preparado es el momento de proceder a la congelación, que ha de ser lenta y progresiva ($-1^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$); para ello coger el recipiente de congelación Mr. Frosty y comprobar que contenga el volumen que este requiere de isopropanol, si no lo tiene añadirlo (realizar este paso bajo una campana de extracción de gases), o coger el recipiente de congelación Cooler y comprobar que el anillo térmico se encuentre a la misma temperatura que las células y además el recipiente tiene que estar lleno de criotubos con 1mL (contrapesos para que la congelación sea uniforme).



CoolCell (Cooler)



Mr. Frosty

16 Introducir los crioviales en su interior y llevarlo al congelador de -80°C .



16.1 A las 4 horas se completa la congelación de los criotubos, con lo que a partir de ese momento podemos transportar los criotubos (siempre manteniéndolos en hielo seco) hasta el tanque de nitrógeno líquido o al lugar de almacenaje pertinente (en nuestro caso el ultracongelador de -150°C).



17 Una vez finalizado el proceso, limpiamos y recogemos toda la zona de trabajo y los materiales empleados (la campana debe limpiarse con etanol al 70% y encender la luz UV al menos 10 minutos), además desechar los residuos en su contenedor correspondiente.