

植物培養細胞の 超低温保存

Version 1.3

国立研究開発法人理化学研究所
バイオリソース研究センター
実験植物開発室

2018年8月15日

植物細胞

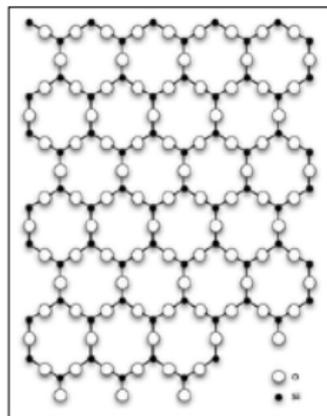


冷却

細胞内凍結

細胞内構造の破壊
イオンの流出
pHの変化

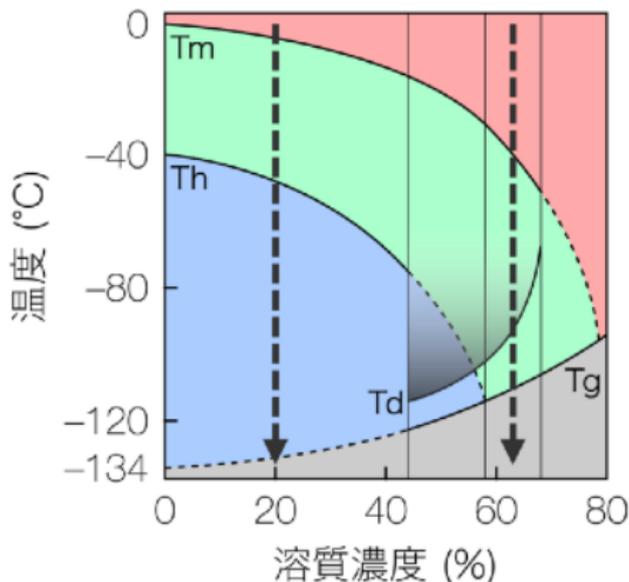
結晶



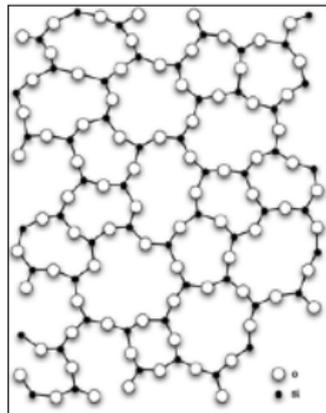
出典: 参考文献 [1]

ガラス化

ガラス：液体を急速にガラス転移温度以下に冷却することによって形成される非晶質の固体



非晶質



出典: 参考文献 [2]

- T_m : 融点
- T_h : 均質核生成温度
- T_g : ガラス転移温度
- T_d : 再結晶化温度

超低温保存の手順

前処理

脱水耐性の付与



脱水

細胞質の濃縮
水分含量の減少

- 凍結脱水（緩速予備凍結法）
- 浸透脱水（ガラス化法）
- 風乾（乾燥法）

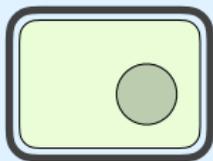


急速冷却

ガラス化の誘導

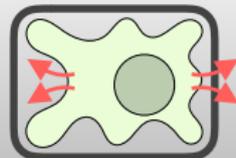
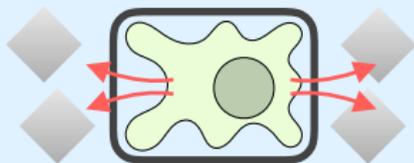
凍結脱水

凍害防御剤液



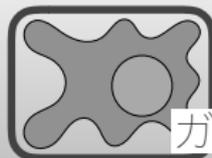
冷却 (0.5-2.0°C/min)

細胞外凍結



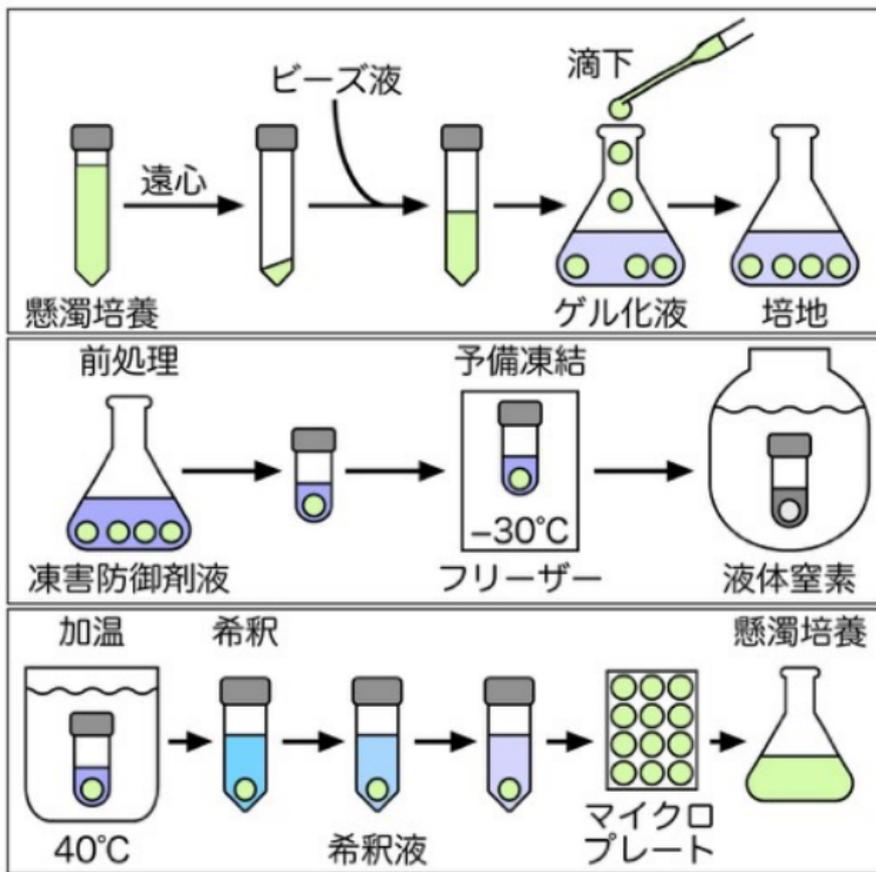
急速冷却 (液体窒素)

凍結



ガラス化 (細胞内)

ビーズ簡易予備凍結法



培養細胞の
健康状態



厳密な操作

高い細胞生存率
細胞増殖能の持続



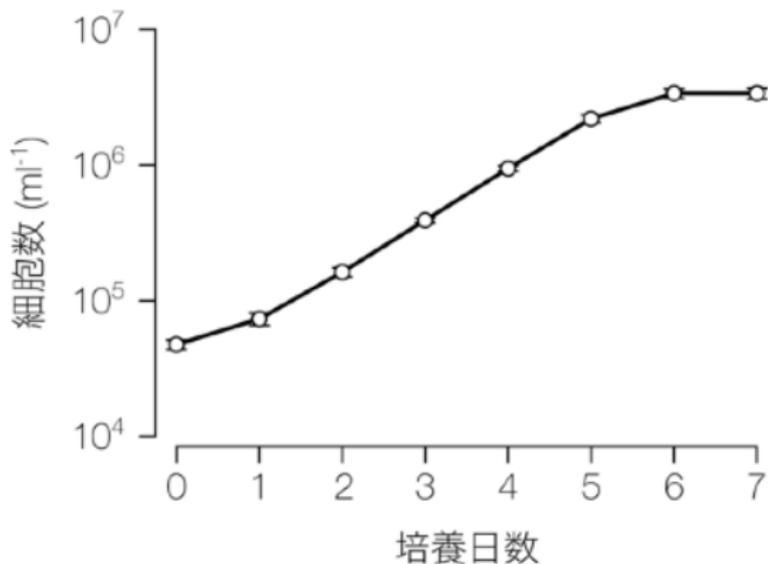
懸濁培養の回復
特性の保持

参考文献

- [1] ファイル:SiO2_-_Quarz_-_2D.png, 『フリー百科事典 ウィキペディア日本語版』 (2006年2月11日 (土) 17:44 UTC)
https://ja.wikipedia.org/wiki/ファイル:SiO2_-_Quarz_-_2D.png
- [2] ファイル:SiO2_-_Glas_-_2D.png, 『フリー百科事典 ウィキペディア日本語版』 (2006年2月11日 (土) 17:44 UTC)
https://ja.wikipedia.org/wiki/ファイル:SiO2_-_Glas_-_2D.png
- [3] 平井泰 (2001) 栄養繁殖性作物のビーズガラス化法による超低温保存に関する研究. 北海道立中央農業試験場報告 No. 99.
<http://agriknowledge.affrc.go.jp/RN/2010630232.pdf>

參考資料

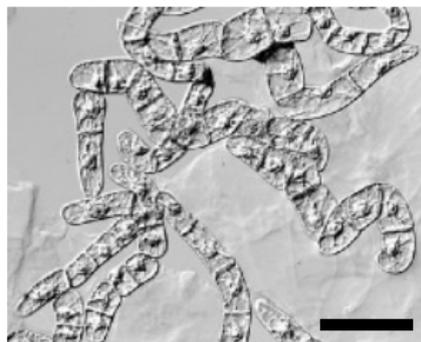
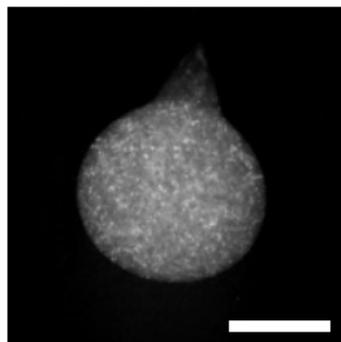
タバコBY-2の増殖



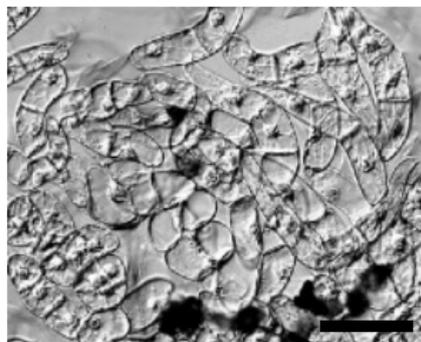
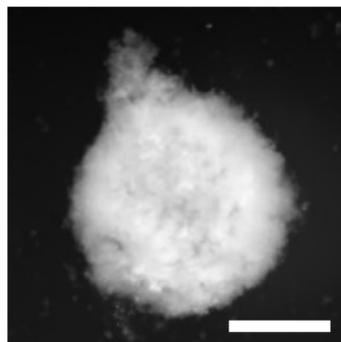
50 μm

ビーズカプセル化

0日目



7日目

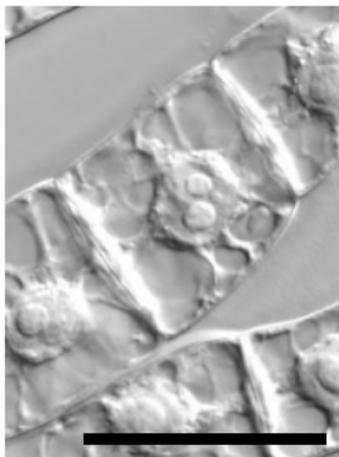


2 mm

100 μ m

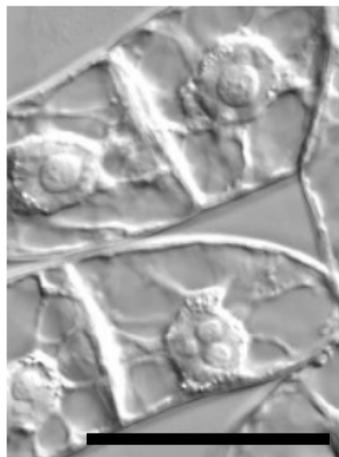
エバンスブルー染色

Control

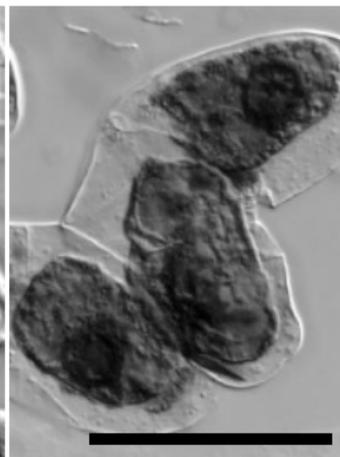


Cryopreservation

Alive



Dead



50 μ m

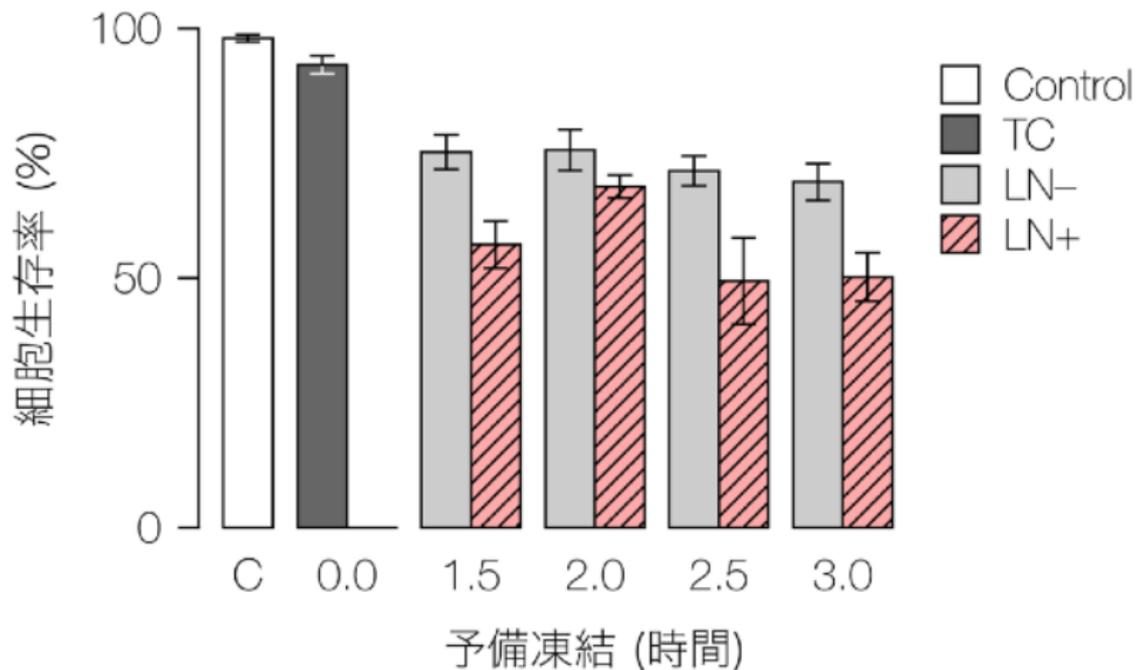
基本保存条件

凍害防御剤液： 2 M グリセロール
0.4 M ショ糖

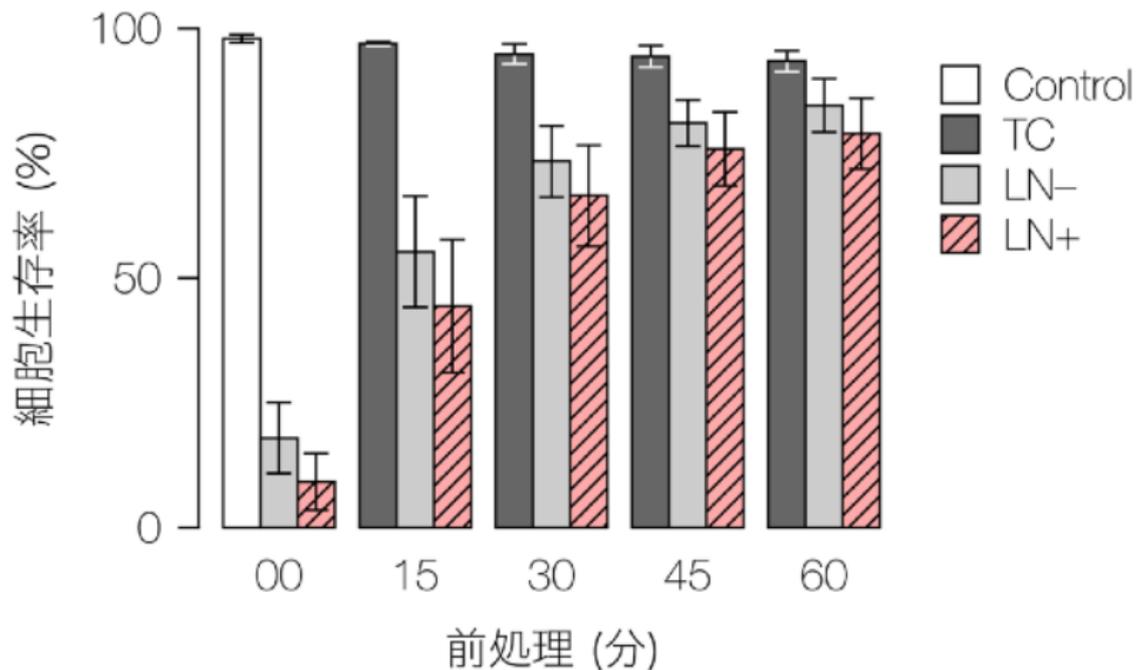
前処理：60 分

予備凍結：2 時間

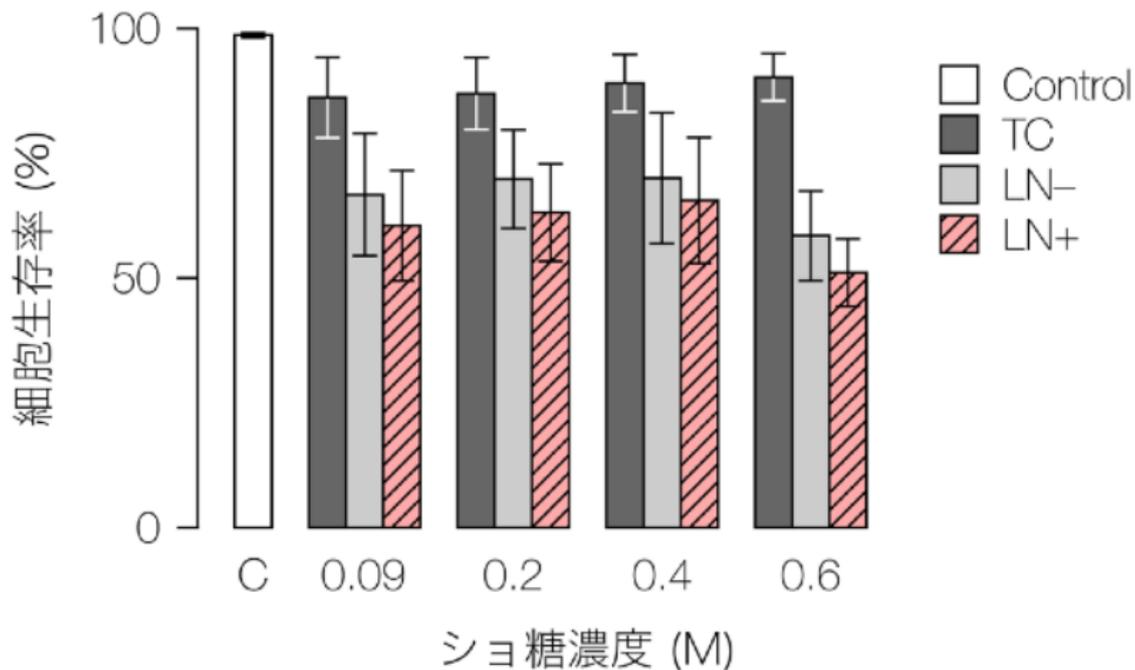
予備凍結



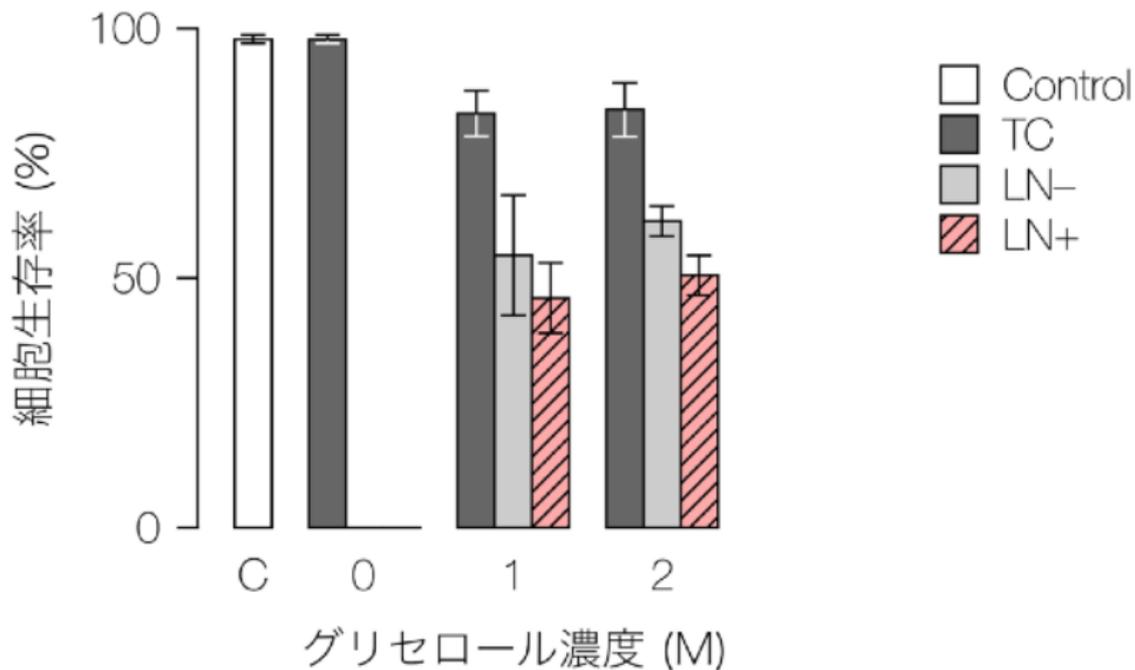
前处理



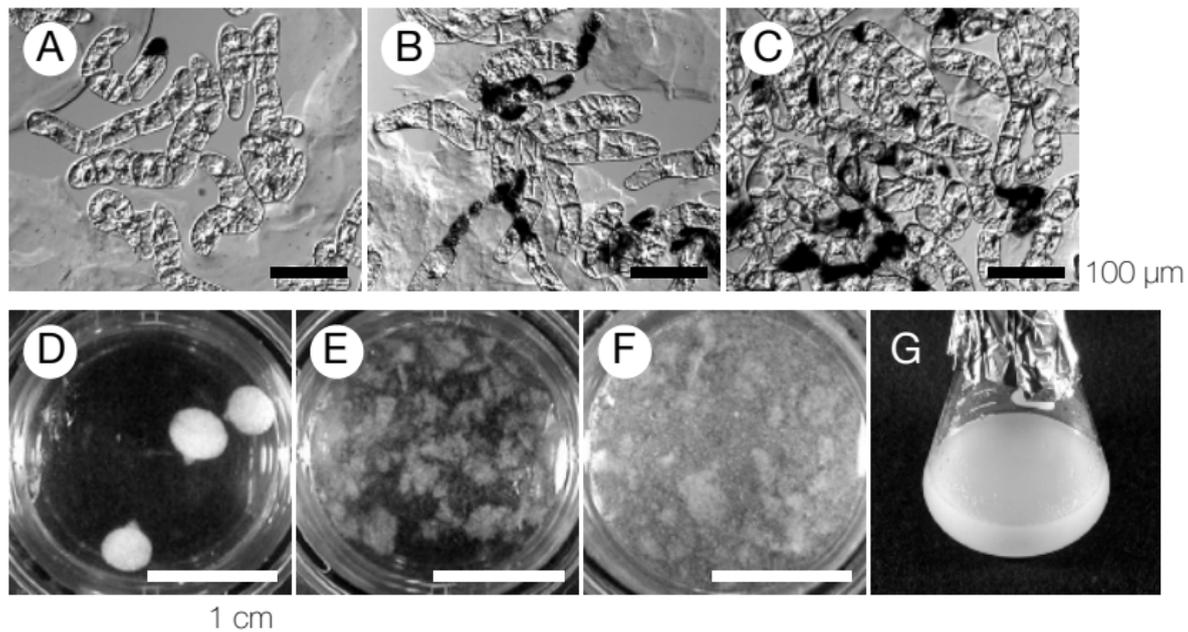
シヨ糖濃度



グリセロール濃度

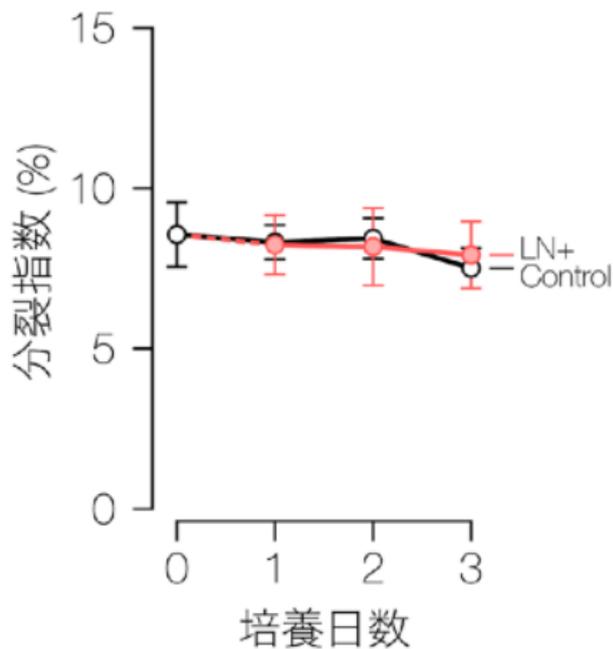
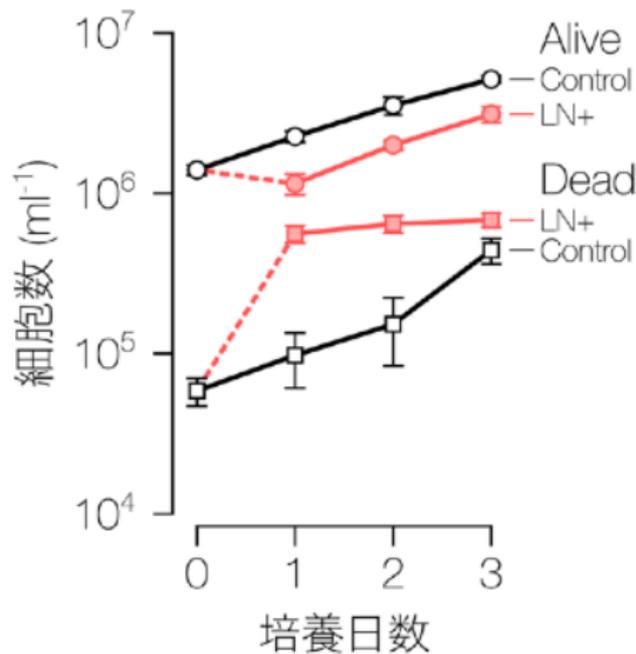


再増殖

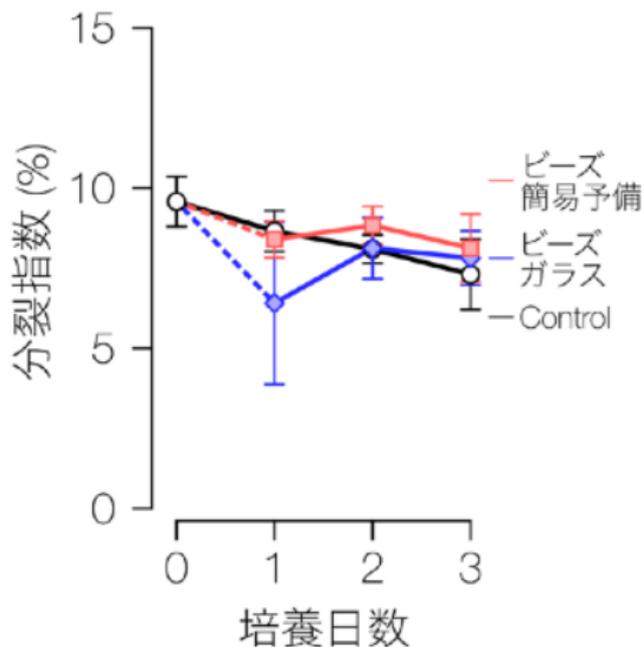
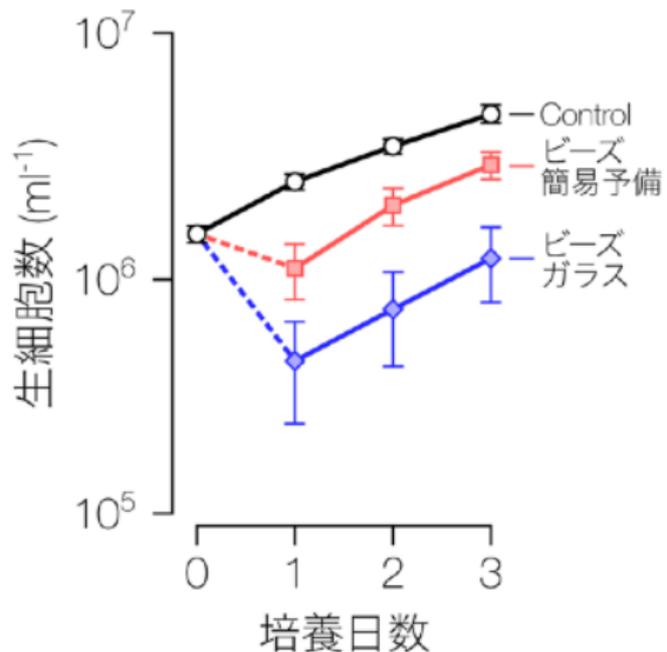


A: 保存前; B: 1日目; C, D: 3日目;
E: ビーズ破碎(3日目); F: 7日目; G: 懸濁培養

再增殖



保存法による再増殖の違い



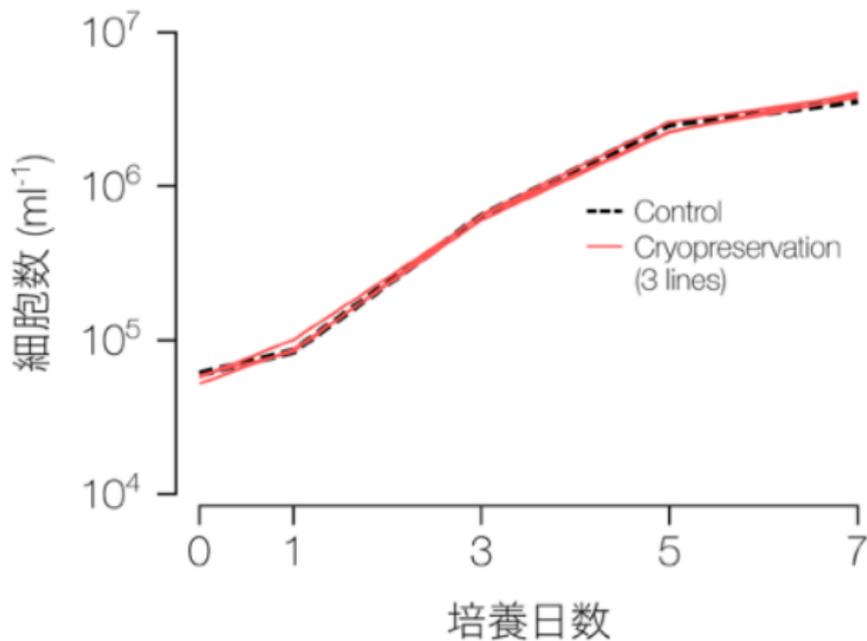
保存効率

方法	細胞生存率 ^a	再増殖率 ^b	培養日数 ^c
ビーズ 簡易予備凍結法	63.1 ± 6.5	100	< 7
ビーズ ガラス化法	29.0 ± 4.7	93.5	< 14

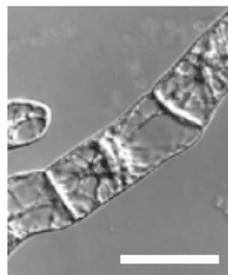
^a 培養1日目の細胞生存率(エバンスブルー排除法)

^b 1バイアル(3ビーズ)から懸濁培養を誘導した場合の成功率

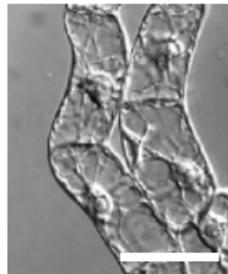
液体窒素保存後の特性



Control



Cryopreservation



50 μm

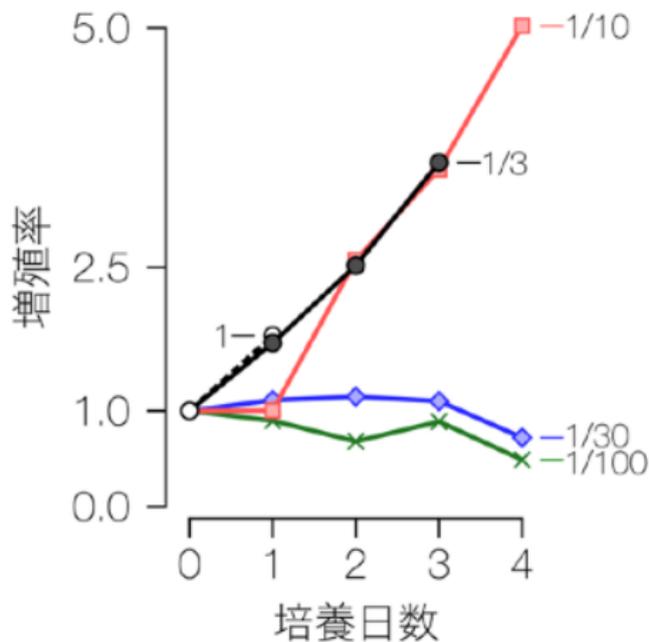
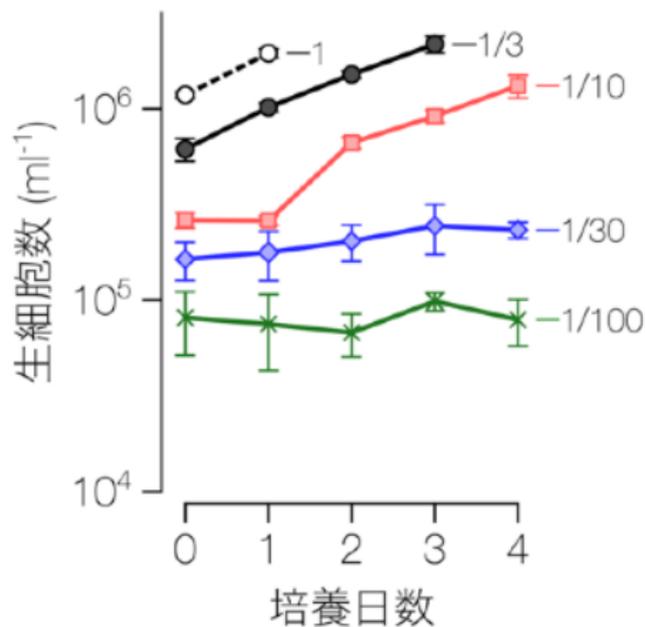
保存前の状態の影響

試料 ^a	細胞生存率 (%) ^b	
	保存前	保存後
1週目	90.6	50.1
2週目	94.7	71.5
3週目	97.0	67.8

^a BY-2は1週間毎に継代し、継代3日目に保存操作を行った。

^b

細胞密度の効果



1 = 通常の細胞密度 (0.25 ml PCV/ml)

3 ビーズ / 3 ml 培地

シロイヌナズナ培養細胞株

細胞株 ^a	前処理 (分)	予備凍結 (時間)	細胞生存率 ^b (相対%)	再増殖率 ^c (%)
T87 ^d	40	3.0	55 ~ 60	100
ColL23-2	75	1.0	36.0 ± 4.1	100
ColL23-3	60	1.5	4.6	0
LerL	60	1.0	59.5 ± 4.6	100
WsL	60	2.0	3.3	0
WsL23	75	1.5	65.0 ± 11.9	100
WsL45	60	1.5	50.6 ± 4.9	100

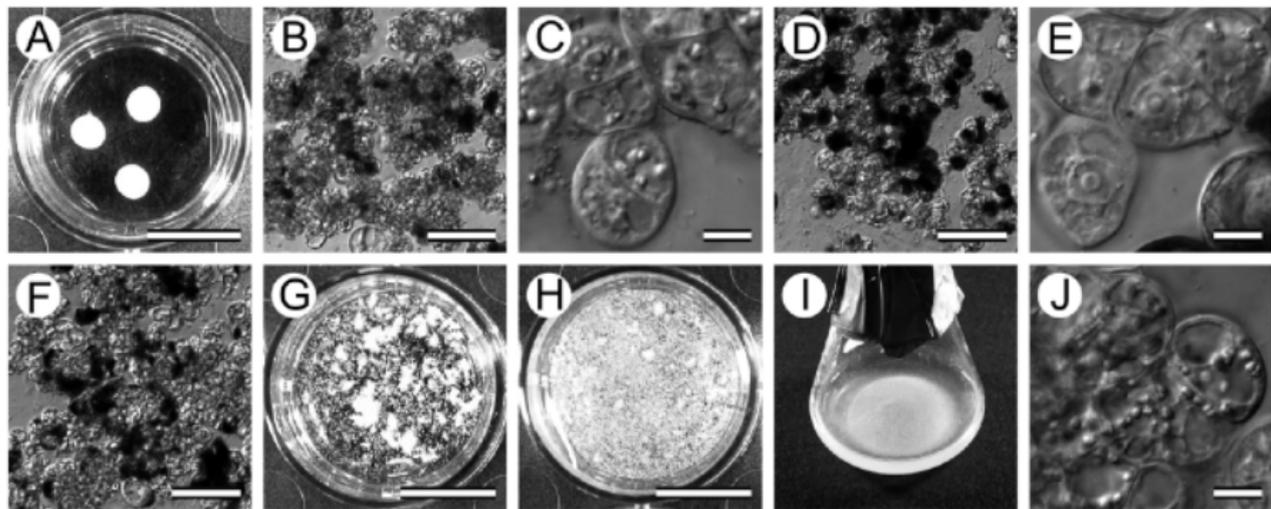
^a ビーズ簡易予備凍結法で保存

^b 培養1日目にTTC還元法で測定(無処理に対する相対%)

^c 培養14日目に測定(合計30バイアル、ColL23-3およびWsLは5バイアル)

^d 山崎 恭彦 (山崎(大)研究室)

シロイヌナズナ WsL45



A: アルギン酸ビーズ; B, C: 保存前; D, E: 1日目;
F: 3日目; G: ビーズ破砕(3日目); H: 7日目;
I, J: 移植7日目(14日目)

生存率測定 (TTC還元法)

シロイヌナズナ WsL

