

タバコ BY-2 の超低温保存*1

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

バージョン 6.2 (2022 年 8 月 1 日)

*1 このプロトコールは理研バイオリソース技術研修で使用するために作成した。

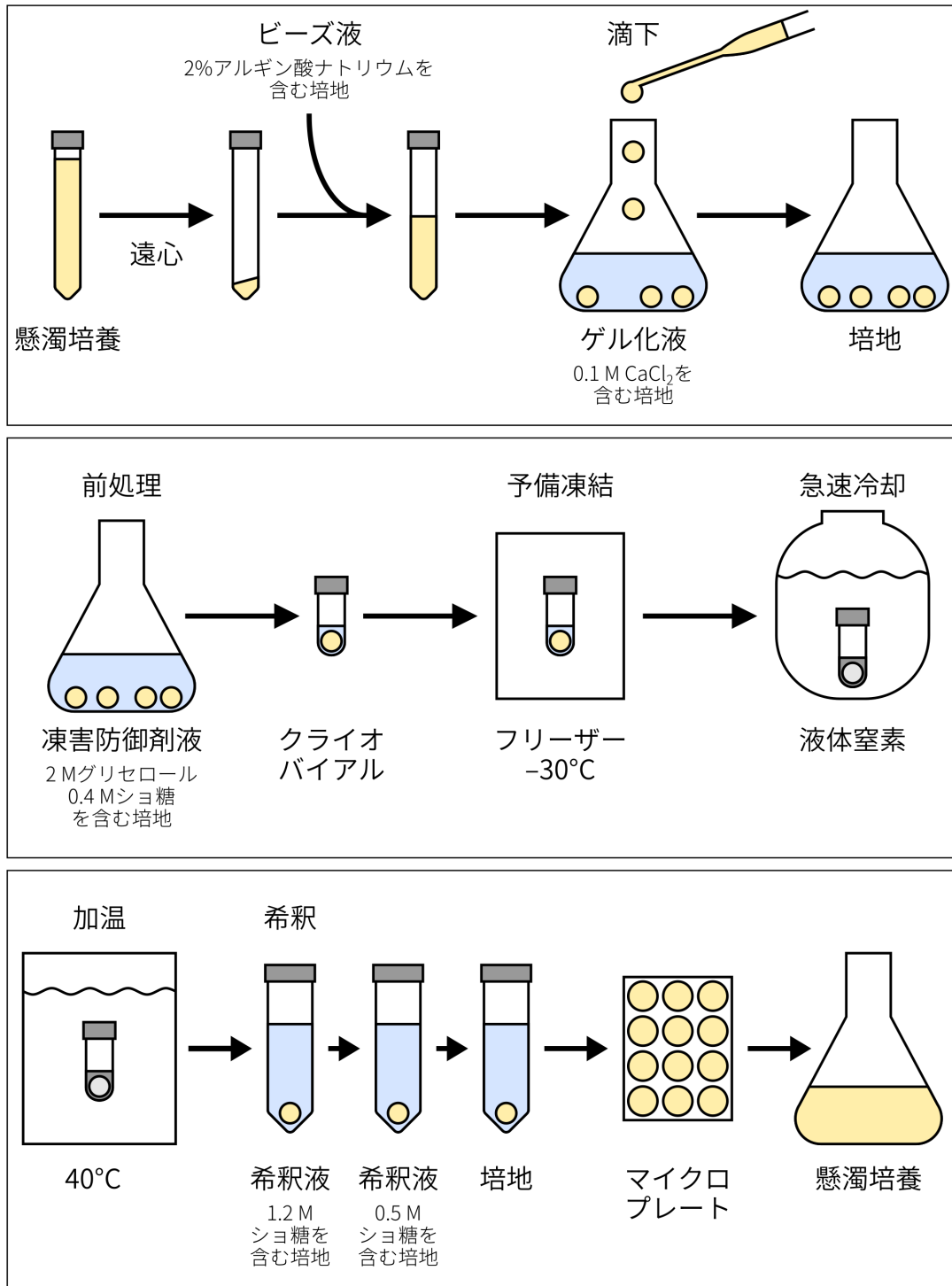


図1 概要

1 材料

1.1 植物培養細胞

- 継代後 3 日目のタバコ BY-2 懸濁培養細胞*2

1.2 試薬

■ 超低温保存

- (1) 基本培地：modified Linsmaier and Skoog (mLS) 培地*3

ムラシゲ・スクーグ培地用混合塩類	1 袋
ショ糖	30 g
BY2_P	2.5 mL
LS_VT_modified	2.5 mL
2,4-D (0.2 mg/mL)	1 mL
H ₂ O	
<hr/>	
	1 L

pH 5.8 に調整

- (2) ビーズ液：2% (w/v) アルギン酸ナトリウムを含む培地

基本培地*4	100 mL
アルギン酸ナトリウム*5	2 g
<hr/>	

約 60°C に加温して攪拌し、溶解

オートクレーブ滅菌

- (3) 3 M 塩化カルシウム溶液（滅菌済み）

塩化カルシウム二水和物	22.1 g
H ₂ O	
<hr/>	
	50 mL

フィルター滅菌またはオートクレーブ

- (4) ゲル化液：0.1 M 塩化カルシウムを含む培地

*2 継代後 3 日目は対数増殖期に該当する。BY-2 の培養方法の詳細は RIKEN BRC plant cell line documentation (https://plant.rtc.riken.jp/resource/cell_line/web_documents/cell_lines/rpc00001.html) を参照。

*3 詳細は RIKEN BRC plant cell line documentation (https://plant.rtc.riken.jp/resource/cell_line/web_documents/media/medium_1.html) を参照。

*4 一般にカルシウムイオンを含まない培地を用いるが、基本培地 (mLS 培地の場合、3 mM 塩化カルシウムを含む) を用いても特に問題ない。

*5 アルギン酸ナトリウム 300~400 (No. 190-09991、和光純薬工業)

基本培地（滅菌済み）	60 mL
3 M 塩化カルシウム溶液（滅菌済み）	2 mL

(5) 2× 基本培地：炭素源（シヨ糖）を加えず、その他の培地成分を2倍量含む培地

ムラシゲ・スクーグ培地用混合塩類	1 袋
BY2_P	2.5 mL
LS_VT_modified	2.5 mL
2,4-D (0.2 mg/mL)	1 mL
H ₂ O	
<hr/>	
	500 mL

(6) 凍害防御剤液：2 M グリセロール、0.4 M シヨ糖を含む培地

2× 基本培地	150 mL
グリセロール	55.3 g
シヨ糖	41.1 g
H ₂ O	
<hr/>	
	300 mL

pH 5.8 に調整
オートクレーブ滅菌

■ 再培養

(1) 希釈液（1.2 M）：1.2 M シヨ糖を含む培地

2× 基本培地	150 mL
シヨ糖	123.2 g
H ₂ O	
<hr/>	
	300 mL

pH 5.8 に調整
オートクレーブ滅菌

(2) 希釈液（0.5 M）：0.5 M シヨ糖を含む培地

2× 基本培地	150 mL
シヨ糖	51.3 g
H ₂ O	
<hr/>	
	300 mL

pH 5.8 に調整
オートクレーブ滅菌

■ 細胞生存率の測定

(1) 10 mg mL⁻¹ エバンスブルー溶液

エバンスブルー	100 mg
H ₂ O	
<hr/>	
	10 mL

(2) エバンスブルー染色液：1 mg mL⁻¹ エバンスブルーを含む培地

基本培地	9 mL
10 mg mL ⁻¹ エバンスブルー溶液	1 mL

1.3 器具

■ 超低温保存

- ピペット
- 15 mL コニカルチューブ
- 200 mL フラスコ
- パスツールピペット
- ピンセット
- 2.0 mL クライオバイアル (丸底)*⁶
- バイアルラック (図??)
- ケーン
- デュワー瓶
- 低速遠心機
- 振とう機
- フリーザー (-30°C)

■ 再培養

- 50 mL コニカルチューブ
- ピペット

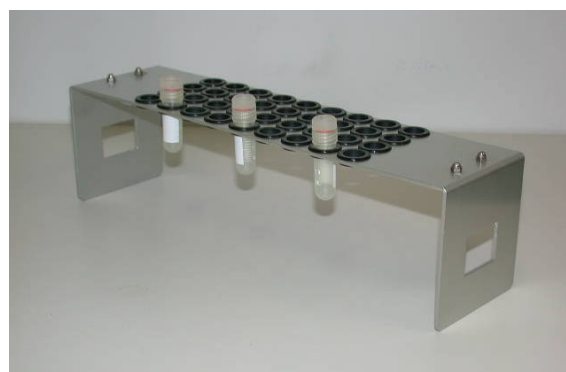


図2 試料部分が覆われないもの
1.5 (2) mL チューブ用ラック TR4002 (マイクロ
チューブミキサー MT-400 付属品、トミー精工)

*⁶ Cryo.s・2 mL・PP・丸底・内蓋 (No. 121263、Greiner Bio-One)

- ピンセット
- 12 ウェルマイクロプレート^{*7}
- マイクロスパーテル
- ウォーターバス
- シェーカー

■ 細胞生存率の測定

- メス替え刃
- 12 ウェルマイクロプレート
- ピンセット
- スライドグラス・カバーガラス
- 顕微鏡

2 方法

2.1 超低温保存

- (1) 培養細胞の状態を顕微鏡で確認する^{*8}。
- (2) 培養細胞を 15 mL コニカルチューブに入れ、遠心（約 $100 \times g \cdot 5$ 分）する。
- (3) 細胞量を目算した後、ピペットを用いて上清をできるだけ除く。
- (4) 3~4 倍量のビーズ液を加え、チューブをよく振って培養細胞を懸濁する。
- (5) 200 mL フラスコに約 60 mL のゲル化液を分注する。
- (6) パスツールピペットを用いて^{*9}、細胞懸濁液をゲル化液の中に 1 滴ずつ滴下して、ビーズを作製する^{*10}。
- (7) 5~10 分振とうする^{*11}。

^{*7} Falcon 12 ウェル透明平底処理済マルチウェル・セルカルチャープレート (No. 351143, Corning)

^{*8} 超低温保存には培養細胞の生理的状态が最も重要である。細胞のサイズおよび液胞の小さい細胞が最適である。それだけでなく、細胞生存率や細胞集団の均一性にも注意する。

^{*9} パスツールピペット以外にピペットマン、2 mL ディスポーザブルピペットなどでもよい。

^{*10} 直径約 4 mm (約 30 μ L) のビーズが形成される。細胞懸濁液を滴下する際、3~4 cm 程の高さから落とすとよい。低すぎると細胞懸濁液がゲル化液の表面に広がり、逆に高すぎると扁平な球形になる。

^{*11} ビーズ液は滴下後即座にゲル化する。ビーズを作製できればよいので、ゲル化液中に長時間置く必要はないと思われる。

- (8) ピペットを用いてゲル化液を除く。
- (9) 約 10 mL の培地を加え、よく攪拌した後に培地を除き、ビーズを洗浄する。
- (10) 約 30 mL の培地を加えて 10~20 分振とうする。
- (11) 培地を除き、約 10 mL の凍害防御剤液でビーズを洗浄する。
- (12) 約 50 mL の凍害防御剤液を加え^{*12}、25°C・1 時間振とうし、前処理を行う^{*13}。
- (13) 300 μ L の凍害防御剤液をクライオバイアルに分注する。
- (14) ピンセットを用いて^{*14}、ビーズ 3 個をバイアルに移す^{*15}。
- (15) バイアルをラックに設置し、 -30°C のフリーザー中で 2 時間保持して^{*16}、予備凍結を行う^{*17}。
- (16) バイアルをケーンに取り付け、速やかに液体窒素に投入する^{*18}。
- (17) 液体窒素保存容器の気相で保存する^{*19}。

2.2 再培養

- (1) 50 mL コニカルチューブに約 30 mL の希釈液 (1.2 M) を分注し、キャップを外しておく。
- (2) クライオバイアルを 40°C の温水に投入し、加温する^{*20*21}。
- (3) 試料を速やかに希釈液 (1.2 M) に移し^{*22}、15 分間穏やかに振とうする^{*23}。

^{*12} 凍害防御剤液の量はビーズ 1 個当たり約 1 mL で十分とされている。

^{*13} 培養細胞に脱水耐性が付与される。

^{*14} 凍害防御剤液を半分ほど捨てた後シャーレへ移すと、操作が容易になる。

^{*15} バイアル当たりのビーズ数は多くてもよいと思われる。試料量 (ビーズと凍害防御剤液の総量) が約 400 μ L になるようにし、ビーズが凍害防御剤液に浸るようにする。

^{*16} バイアルの試料部分が冷気にさらされるようにする。また、バイアルがフリーザーの壁面や床に直接触れないようにする。

^{*17} -30°C まで冷却される間に、培養細胞が徐々に凍結脱水される。従来の緩速予備凍結法では、プログラムフリーザーを用いて冷却速度を厳密に制御する。一方、本方法では自然に冷却するだけのため、試料量・フリーザー内の位置・バイアルの間隔など冷却速度に影響を与える要因に留意する。

^{*18} 適度に脱水した培養細胞を液体窒素で急速に冷却するとガラス化する。それによって、液体窒素中での培養細胞の保存が可能となる。

^{*19} 細胞生存率が著しく低下し、細胞株を回復できないバイアルを保存しても意味はない。そこで、保存時にバイアル 1 本を用いて細胞生存率を確認した後、残りを長期保存に移行する。

^{*20} できるだけ速やかに解凍すると同時に、加温しすぎないように注意する。試料の周辺部分が解凍したら、取り出してよく攪拌し、全体を解凍する。試料部分の温度が通常の培地の温度以下である状態がよいと思われる。

^{*21} 稀にバイアルが破裂する可能性があるので、注意する。

^{*22} 希釈液の量はビーズ 1 個当たり約 1 mL で十分であるが、30 mL 程度使用の方がよいと思われる。希釈液の量が多いので、試料全体を投入してよい。

^{*23} 急激な浸透圧の変化による傷害を避けるために、凍害防御剤液を徐々に希釈する。

- (4) ピペットを用いて希釈液を除き^{*24}、約 30 mL の希釈液 (0.5 M) を加え、15 分間穏やかに振とうする。
- (5) 希釈液を約 30 mL の培地と交換し、15 分間穏やかに振とうする。
- (6) 培地を新鮮培地と交換する。
- (7) 約 3 mL の培地を入れた 12 ウェルマイクロプレート^{*25} にビーズ 3 個を移す^{*26}。
- (8) 3 日間、通常の条件で旋回培養を行う^{*27}。
- (9) マイクロスパーテルを用いて、ビーズを破碎する^{*28}。
- (10) 4 日間、通常の条件 (27°C、暗所、130 rpm) で旋回培養を行う。
- (11) 培養細胞が増殖したら^{*29}、通常のスケールの培養に移行する。

2.3 細胞生存率の測定 (エバンスブルー排除法)

- (1) 再培養 1 日目に^{*30}、メスを用いてビーズの一部を切り取る。
- (2) 12 ウェルマイクロプレートに入れた約 1 mL のエバンスブルー染色液にビーズを浸漬し、約 20 分間静置する。
- (3) ビーズを約 1 mL の培地に移し、約 20 分間静置する。
- (4) ビーズをスライドグラスに乗せ、カバーガラスを被せてゆっくり押しつぶす。
- (5) 顕微鏡で観察し、生細胞数および死細胞数をカウントする^{*31}。

2.4 トラブルシューティング

超低温保存が成功しない場合、保存過程のどのステップに原因があるのかを特定することが問題解決への手がかりになる。そこで、各ステップ (無処理・前処理・予備凍結・液体窒素保存) における細胞の生存を確認

^{*24} もともとビーズに含まれるので、希釈液が多少残ってもよい。

^{*25} 3 mL の培地で旋回培養ができる容器であれば何でもよい。

^{*26} 細胞生存率が低いことが懸念される場合や細胞株を早く確立したい場合などには、ビーズの数を増やしてもよい。その場合、凍害防御剤液のキャリーオーバーに注意した方がよいと思われる。

^{*27} 再培養開始直後にビーズを破碎すると、培養細胞が増殖しにくくなる。浸透圧の急激な低下による傷害および低細胞密度による細胞増殖の抑制が原因と考えられる。

^{*28} 培養細胞が回復し活発に増殖していることを確認した後に行う。培養細胞はビーズ中でも増殖し、やがて培地に遊離する。従って、完全に破碎する必要はないが、表面積を大きくした方が増殖は速くなると考えられる。

^{*29} 増殖にかかる時間は培養物中の生細胞の数に依存する。培養物の状態を見ながら、移植に適切な時期を決定するのがよいと思われる。ビーズ 3 個を培地 3 mL で培養した試験では、細胞生存率 60~70% の場合は再培養開始から 1 週間、30~40% の場合は 2 週間必要であった。

^{*30} 再培養直後には培養細胞が完全に回復していないため、細胞の生死を正確に判別することが困難である。

^{*31} 死細胞が青く染色される。

する。

■ **事例 1：** 液体窒素保存時に細胞生存率が著しく低下した。

バイアル内の状態を観察しながら注意深く加温操作を行うことにより、超低温保存に成功した。同様の事例が何件か報告されており、加温操作にはある程度慣れが必要と思われる。

■ **事例 2：** 予備凍結時のフリーザーの温度が高かった。

表示では -30°C だったが、庫内の温度を実測すると $-25\sim-20^{\circ}\text{C}$ だった。庫内温度 -30°C を確認したフリーザーを用いたところ、超低温保存に成功した。この温度差が超低温保存に大きく影響したと考えられる。

3 参考文献

- Kobayashi T, Niino T, Kobayashi M (2005) Simple cryopreservation protocol with an encapsulation technique for tobacco BY-2 suspension cell cultures. *Plant Biotechnology* 22: 105–112. DOI: [10.5511/plantbiotechnology.22.105](https://doi.org/10.5511/plantbiotechnology.22.105)
- Kobayashi T, Niino T, Kobayashi M (2006) Cryopreservation of tobacco BY-2 suspension cell cultures by vitrification with encapsulation. *Plant Biotechnology* 23: 333–338. DOI: [10.5511/plantbiotechnology.23.333](https://doi.org/10.5511/plantbiotechnology.23.333)
- Menges M, Murray JAH (2004) Cryopreservation of transformed and wild-type Arabidopsis and tobacco cell suspension cultures. *Plant Journal* 37: 635–644. DOI: [10.1046/j.1365-313X.2003.01980.x](https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2003.01980.x)
- Ogawa Y, Sakurai N, Oikawa A, Kai K, Morishita Y, Mori K, Moriya K, Fujii F, Aoki K, Suzuki H, Ohta D, Saito K, Shibata D (2012) High-throughput cryopreservation of plant cell cultures for functional genomics. *Plant and Cell Physiology* 53: 943–952. DOI: [10.1093/pcp/pcs038](https://doi.org/10.1093/pcp/pcs038)
- Sakai A, Kobayashi S, Oiyama I (1991) Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* Osb.) by simple freezing method. *Plant Science* 74: 243–248. DOI: [10.1016/0168-9452\(91\)90052-A](https://doi.org/10.1016/0168-9452(91)90052-A)
- 川原良一・秋田和子 (1996) 培養細胞の簡易凍結法による超低温保存. *組織培養* 22: 348–352
- 酒井昭 (1996) 植物の培養細胞・組織の超低温保存. *植物組織培養* 13: 1–6. DOI: [10.5511/plantbiotechnology1984.13.1](https://doi.org/10.5511/plantbiotechnology1984.13.1)
- 平井泰 (2001) 栄養繁殖性作物のピ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. <https://agriknowledge.affrc.go.jp/RN/2010630232.pdf>

補遺 A シロイヌナズナ T87 の超低温保存

A.1 材料 (追加)

- 継代後 5 日目のシロイヌナズナ T87 懸濁培養細胞^{*32}。
- Jouanneau and Péaud-Lenoël (JPL) 培地 (基本培地)^{*33}
- ステンレスふるい (300 μm)
- 500 mL コニカルフラスコ

A.2 方法

- (1) 基本的にタバコ BY-2 と同じ手順で保存する。
- (2) 500 mL コニカルフラスコにセットしたステンレスふるい (300 μm) を用いて濾過し、小細胞塊を選抜する。
- (3) 遠心後に培地をできるだけ除き、細胞の 1~2 倍量のビーズ液で懸濁する。
- (4) 前処理を 40 分、予備凍結を 3 時間行う。
- (5) 再培養後 3 日間ビーズを旋回培養した後、ビーズを破碎する。さらに 10~14 日間、旋回培養する。

^{*32} 継代後 5 日目は対数増殖期に該当する。T87 の培養方法の詳細は RIKEN BRC plant cell line documentation (https://plant.rtc.riken.jp/resource/cell_line/web_documents/cell_lines/rpc00008.html) を参照。

^{*33} 詳細は RIKEN BRC plant cell line documentation (https://plant.rtc.riken.jp/resource/cell_line/web_documents/media/medium_5.html) を参照。

変更履歴

バージョン 6.0 (2018 年 8 月 15 日)

書式を変更

「基本培地」と「2×基本培地」を脚注から「1.1 試薬 超低温保存」に移動し、作成方法を記載
「補遺 A」に追加の器具を記載

RIKEN BRC plant cell line documentation のリンクを追加

変更履歴を追加

バージョン 6.1 (2019 年 9 月 3 日)

「1 試薬・器具」を「1 材料」に変更

「1.1 植物培養細胞」を追加、「2.1 超低温保存 (1)」の脚注を移動し修正

「補遺 A」を同様に修正

「変更履歴 バージョン 6.0」の書式を修正

リンクを更新

バージョン 6.2 (2022 年 8 月 1 日)

E-mail アドレス「plant@brc.riken.jp」を「plant.brc@riken.jp」に変更

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

〒305-0074 茨城県つくば市高野台 3-1-1

FAX: 029 836 9053

E-mail: plant.brc@riken.jp

<https://epd.brc.riken.jp/ja/>