

植物培養細胞の超低温保存

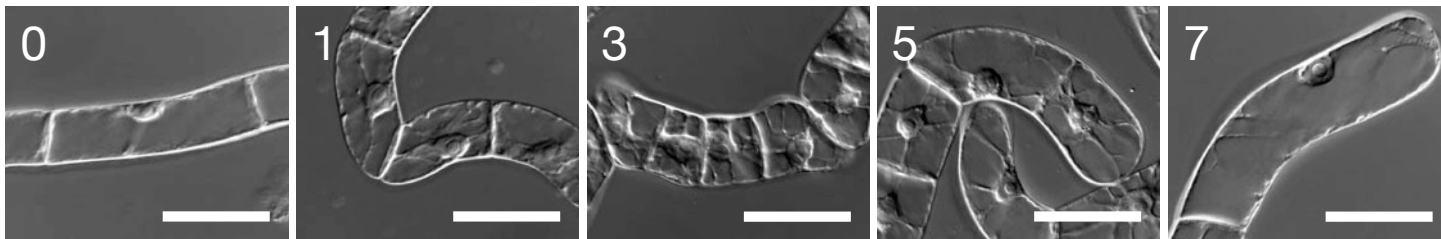
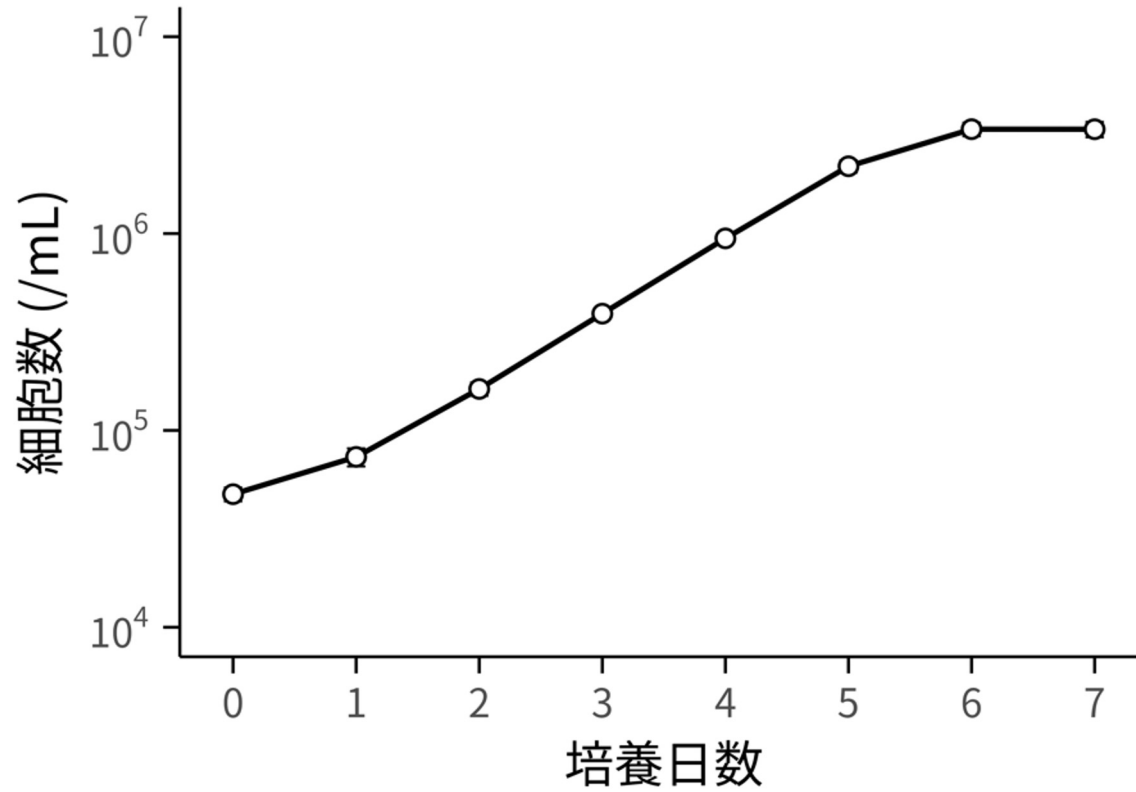
参考資料

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
小林 俊弘



2022年9月12日

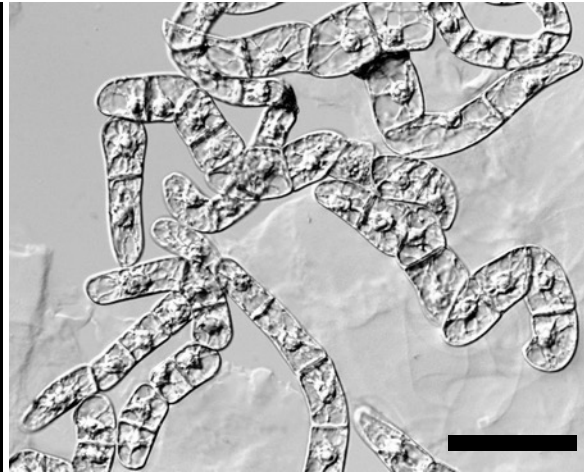
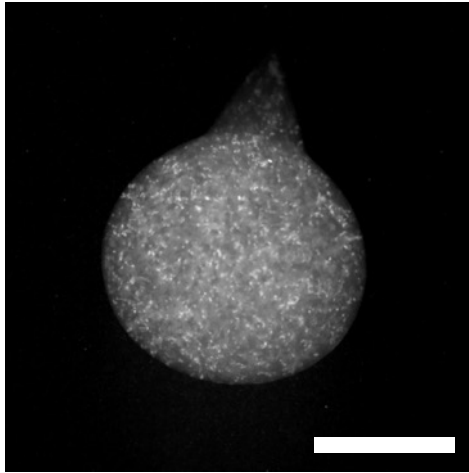
タバコBY-2の増殖



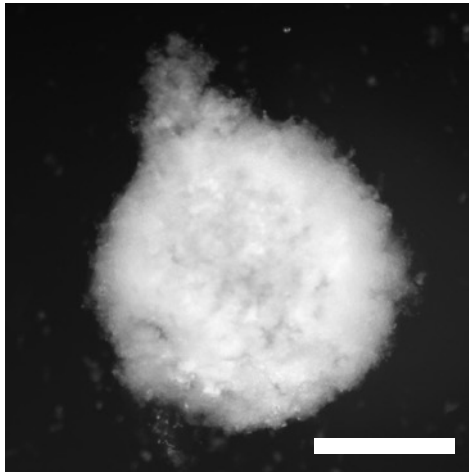
50 μ m

ビーズカプセル化

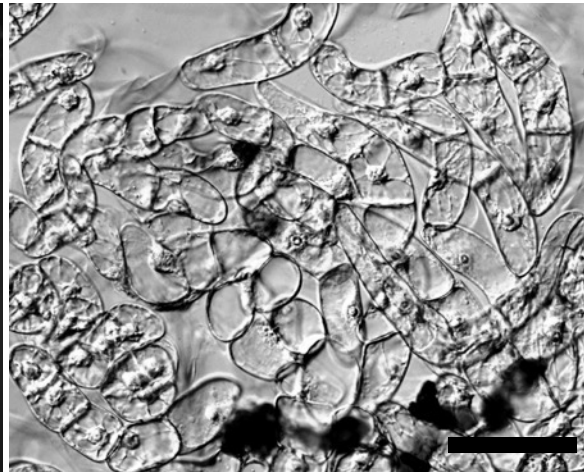
0日目



7日目



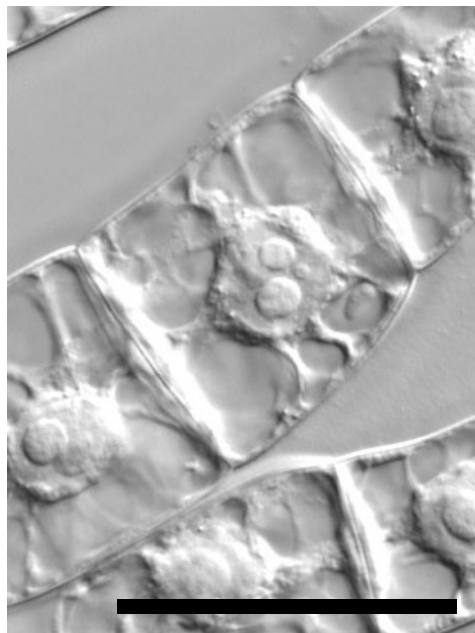
2 mm



100 μ m

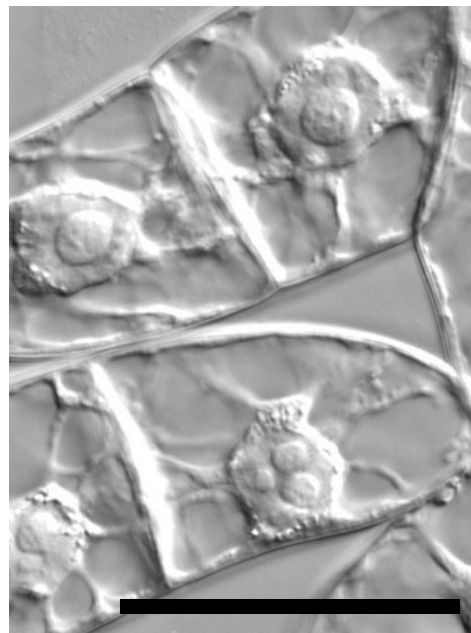
エバンスブルー染色

無処理

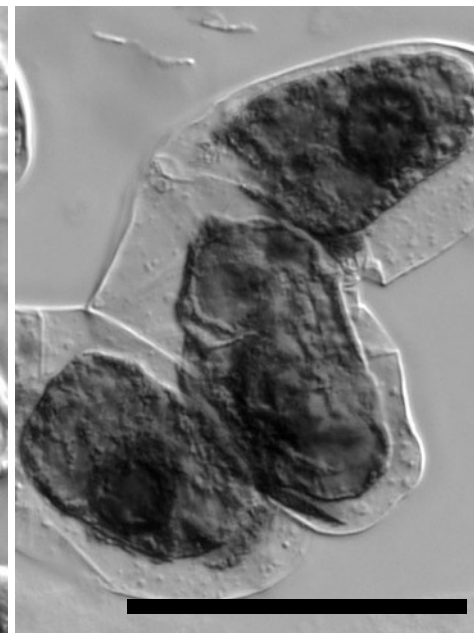


超低温保存

生細胞



死細胞



50 μ m

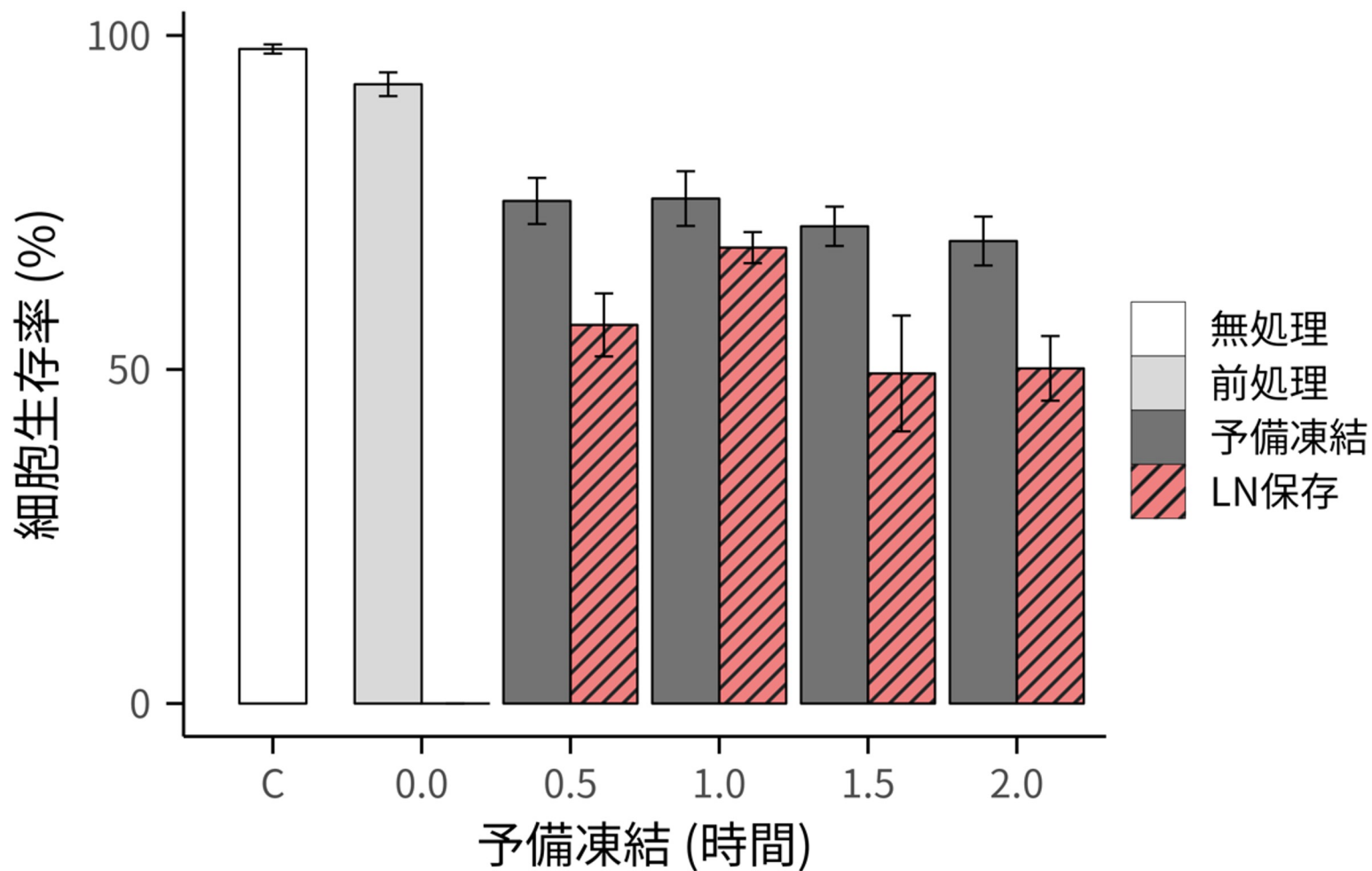
基本保存条件

凍害防御剤液 2 M グリセロール
 0.4 M ショ糖

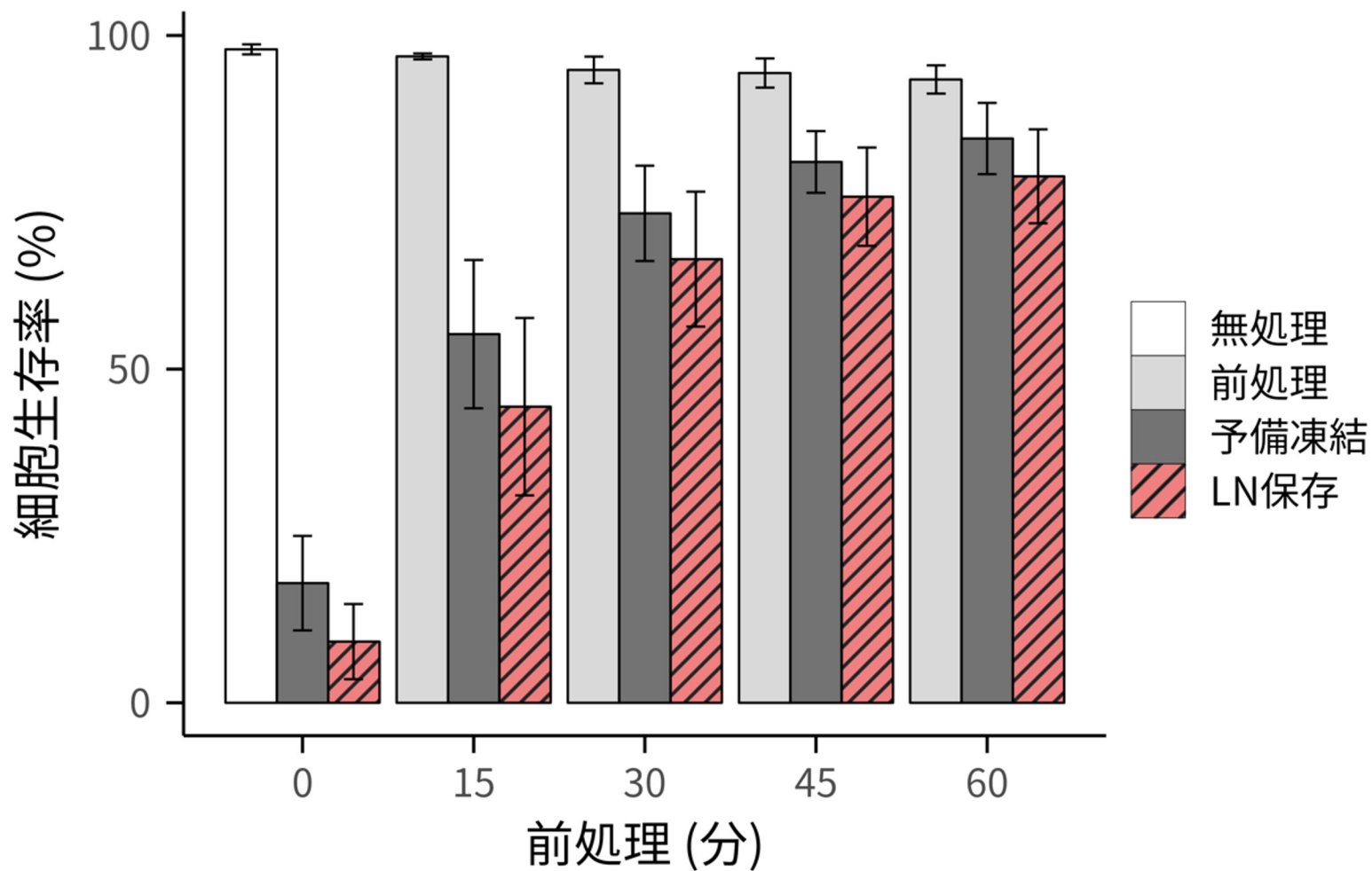
前処理 60 分

予備凍結 2 時間

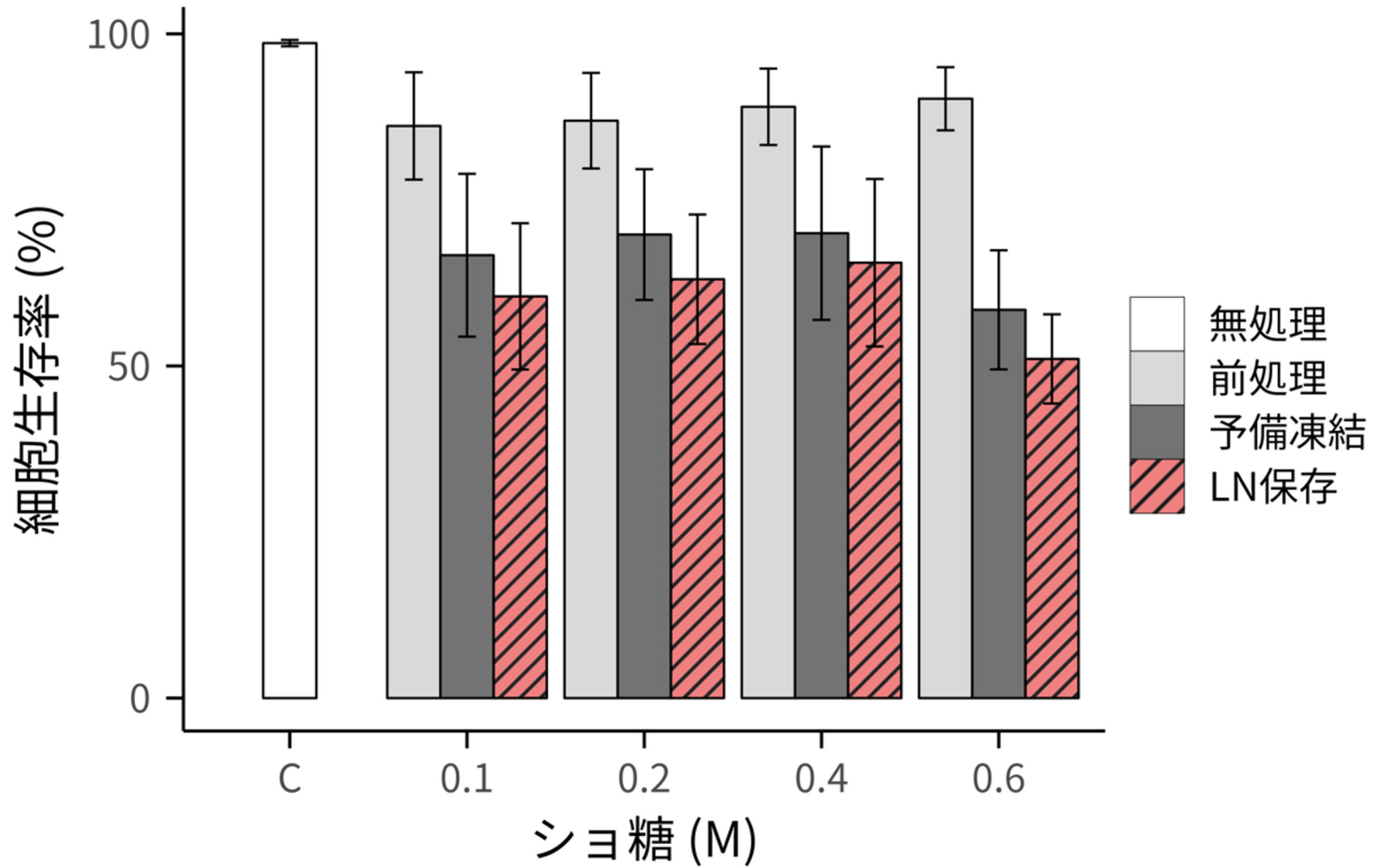
予備凍結



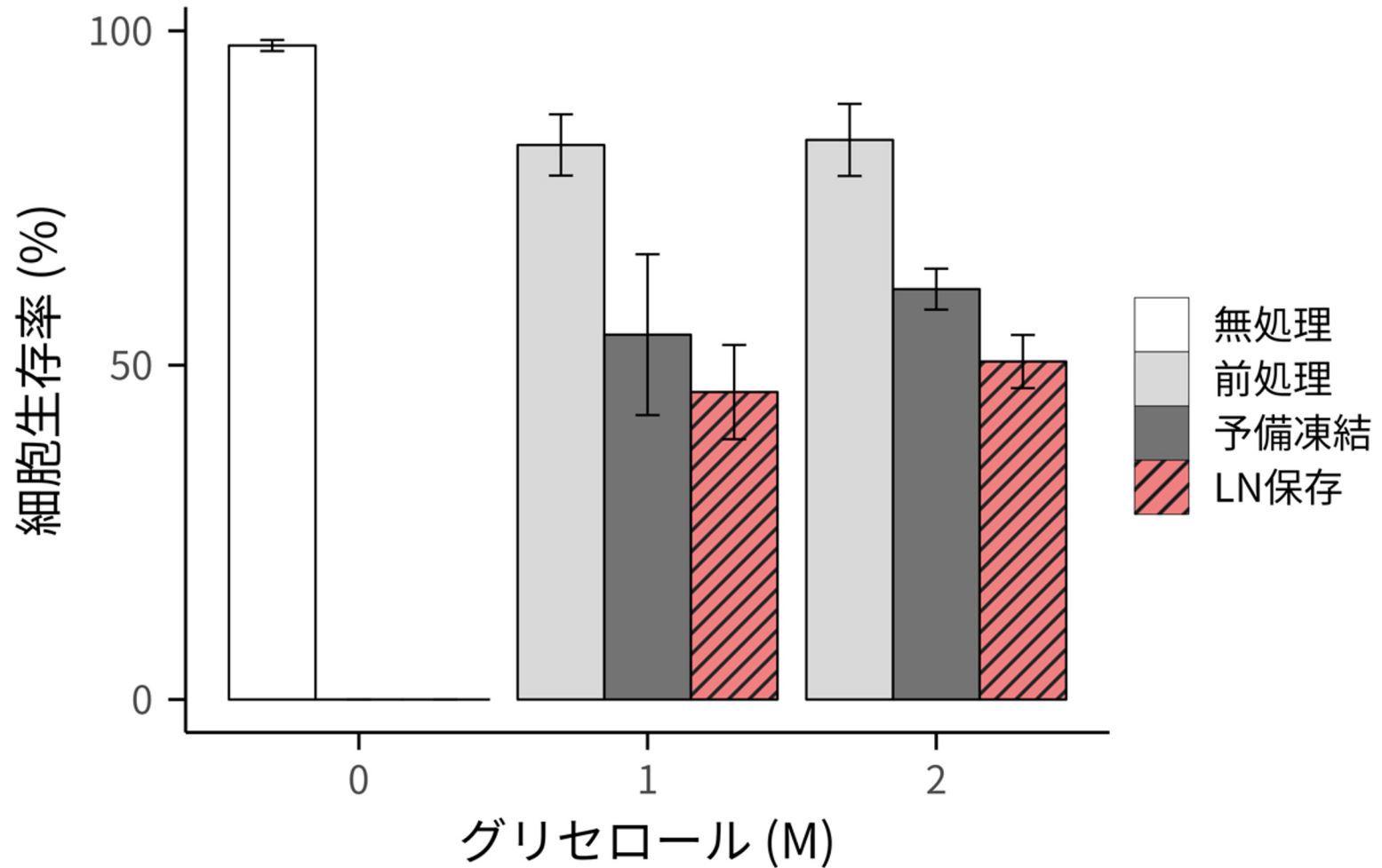
前处理



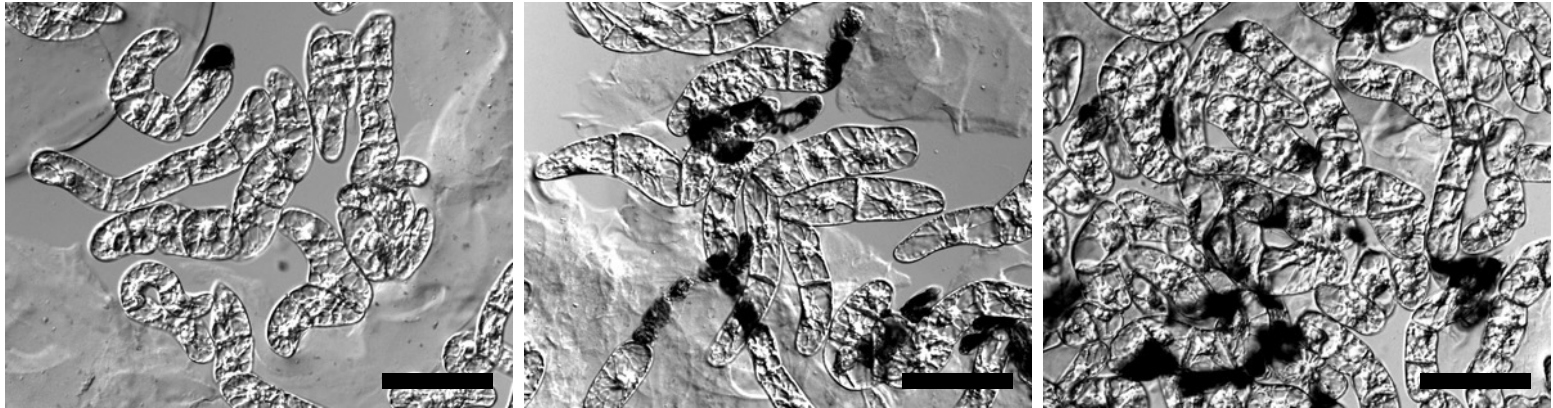
シヨ糖濃度



グリセロール濃度



再増殖

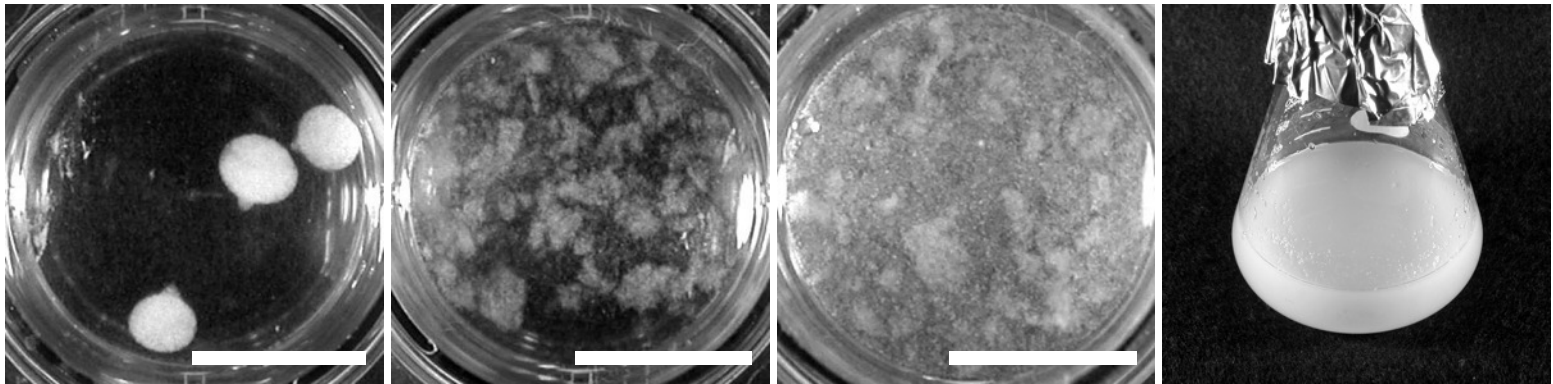


保存前

1日目

3日目

100 μ m



3日目

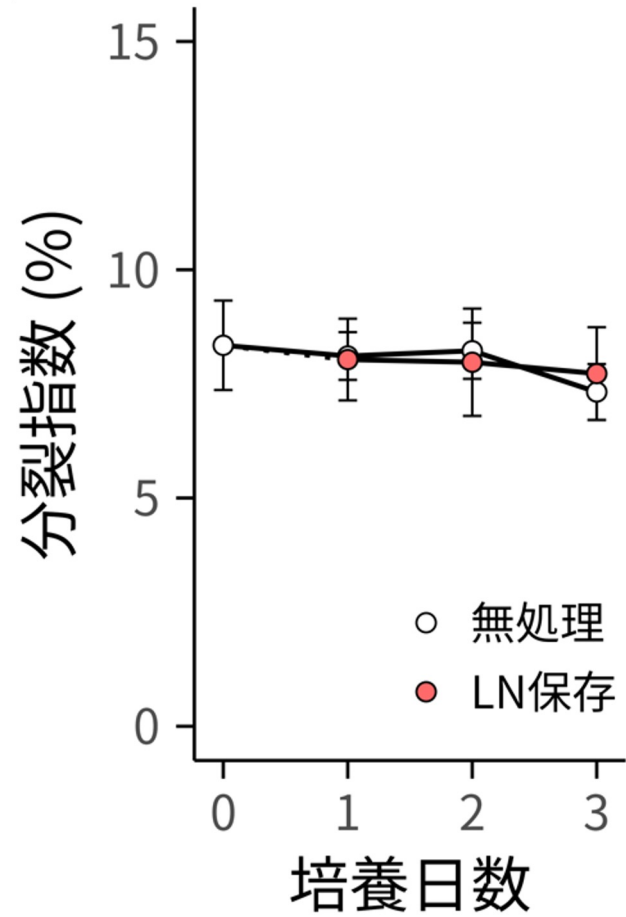
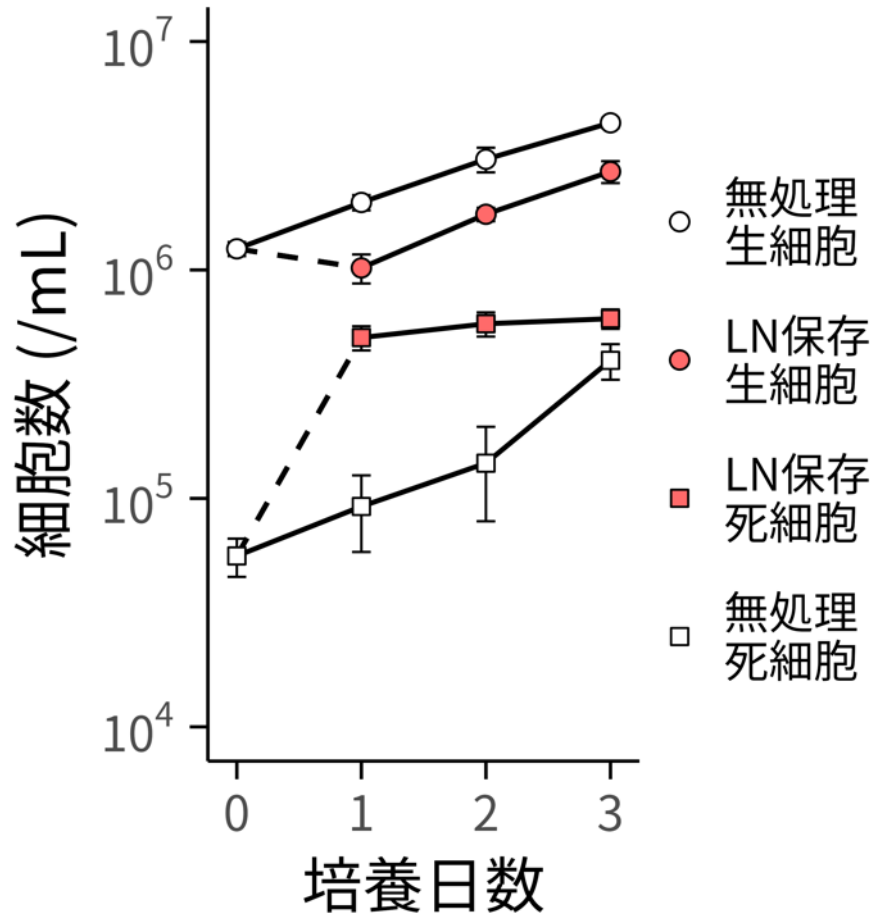
ビーズ破碎
(3日目)

7日目

1 cm

懸濁培養

細胞再増殖



保存効率

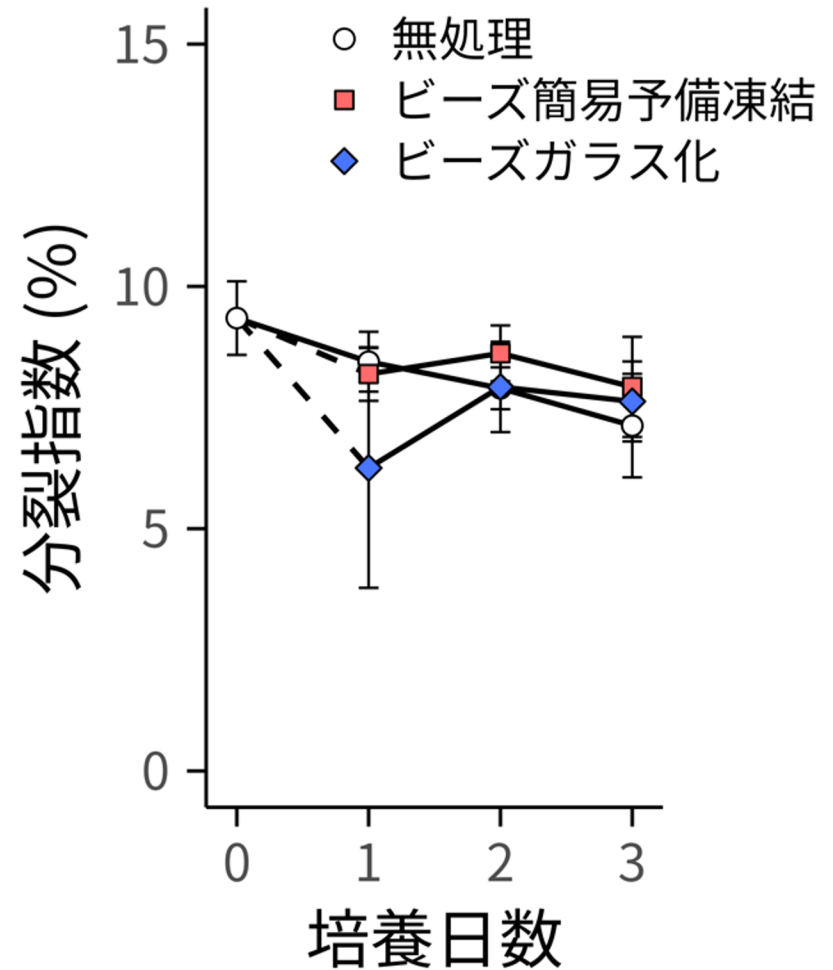
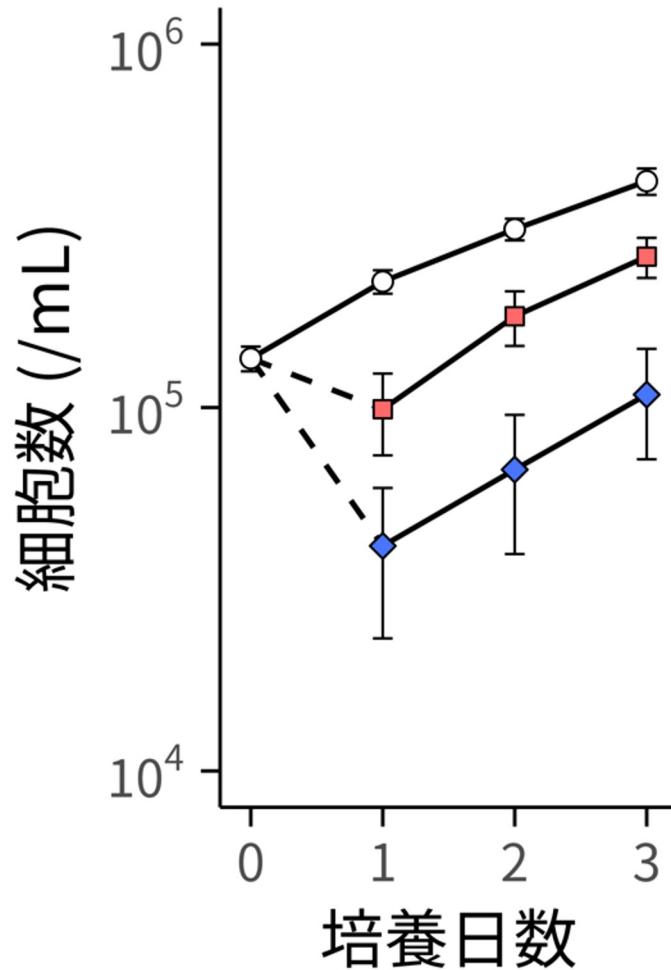
方法	細胞生存率 ^a (%)	再増殖率 ^b (%)	培養日数 ^c
ビーズ 簡易予備凍結法	63.1 ± 6.5	100	< 7
ビーズ ガラス化法	29.0 ± 4.7	93.5	< 14

^a 培養1日目の細胞生存率 (エバンスブルー排除法)

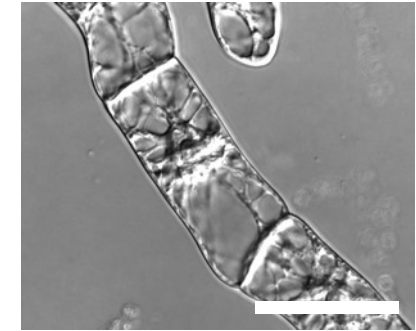
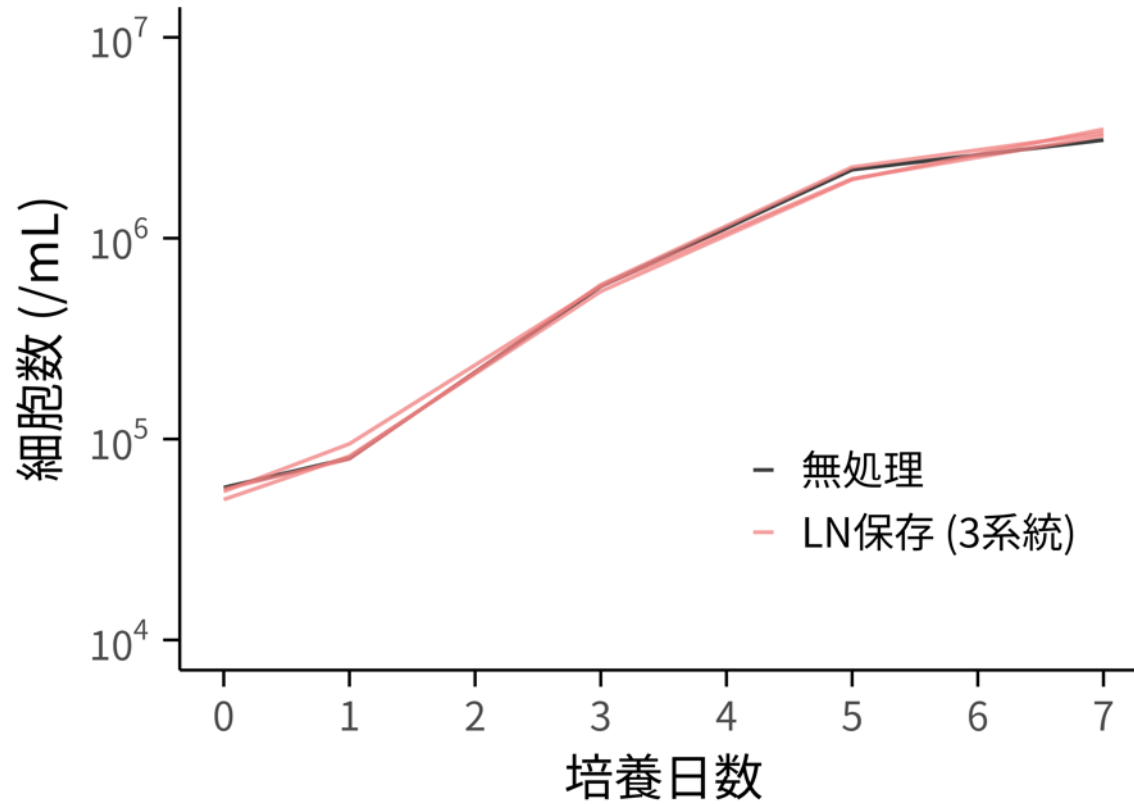
^b 1バイアル (3ビーズ) から懸濁培養を誘導した場合の成功率 (合計30バイアル)

^c 継代可能になるまでに要した日数

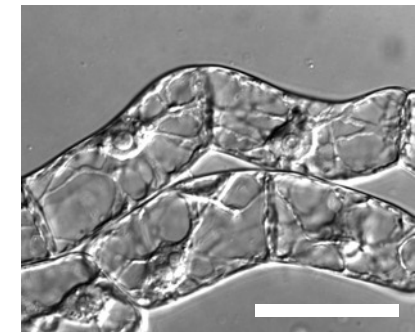
保存法による再増殖の違い



液体窒素保存後の特性



無処理



LN保存 50 μm

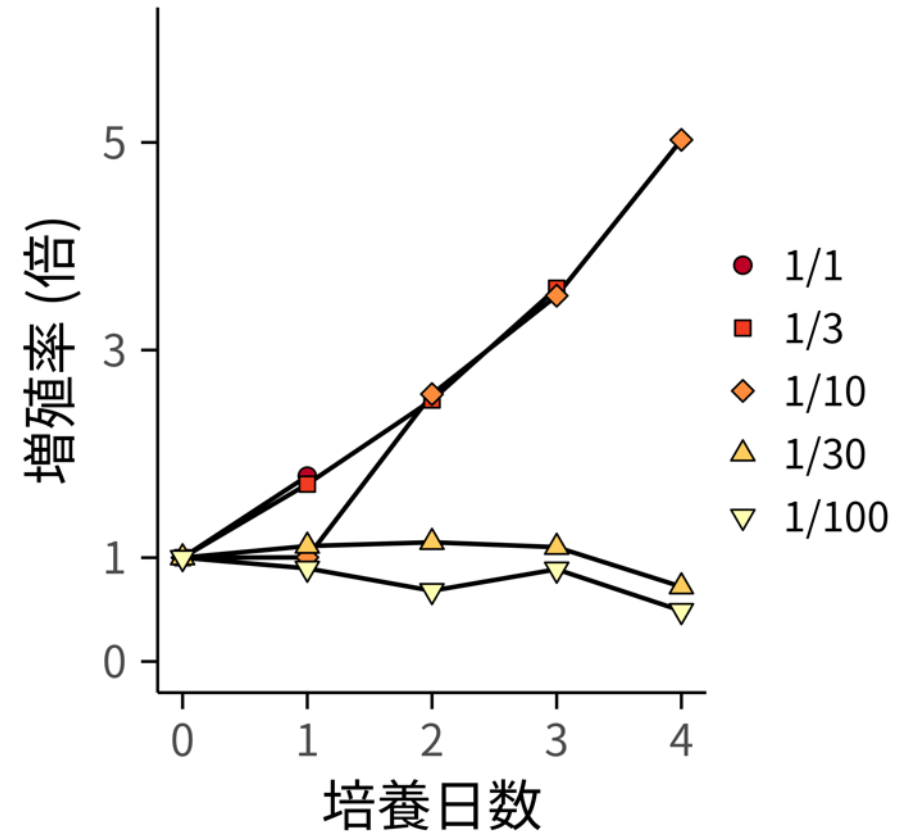
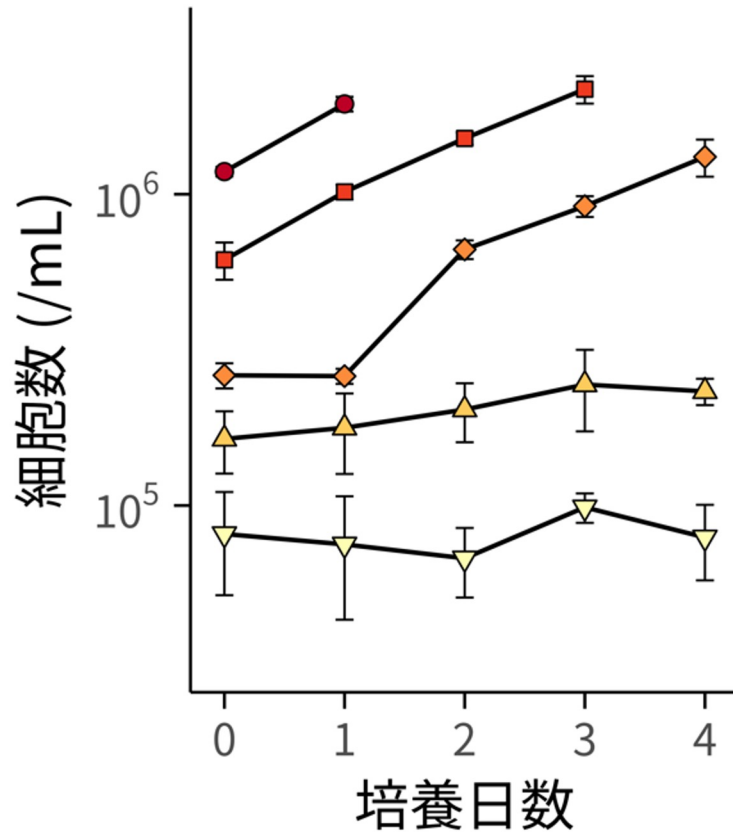
保存前の状態の影響

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 細胞生存率はエバンスブルー排除法で測定した。

細胞密度の効果



- 1/1 = 0.25 mL PCV/mL (通常の細胞密度)
- 3 ビーズ/3 mL 培地

シロイヌナズナ培養細胞

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

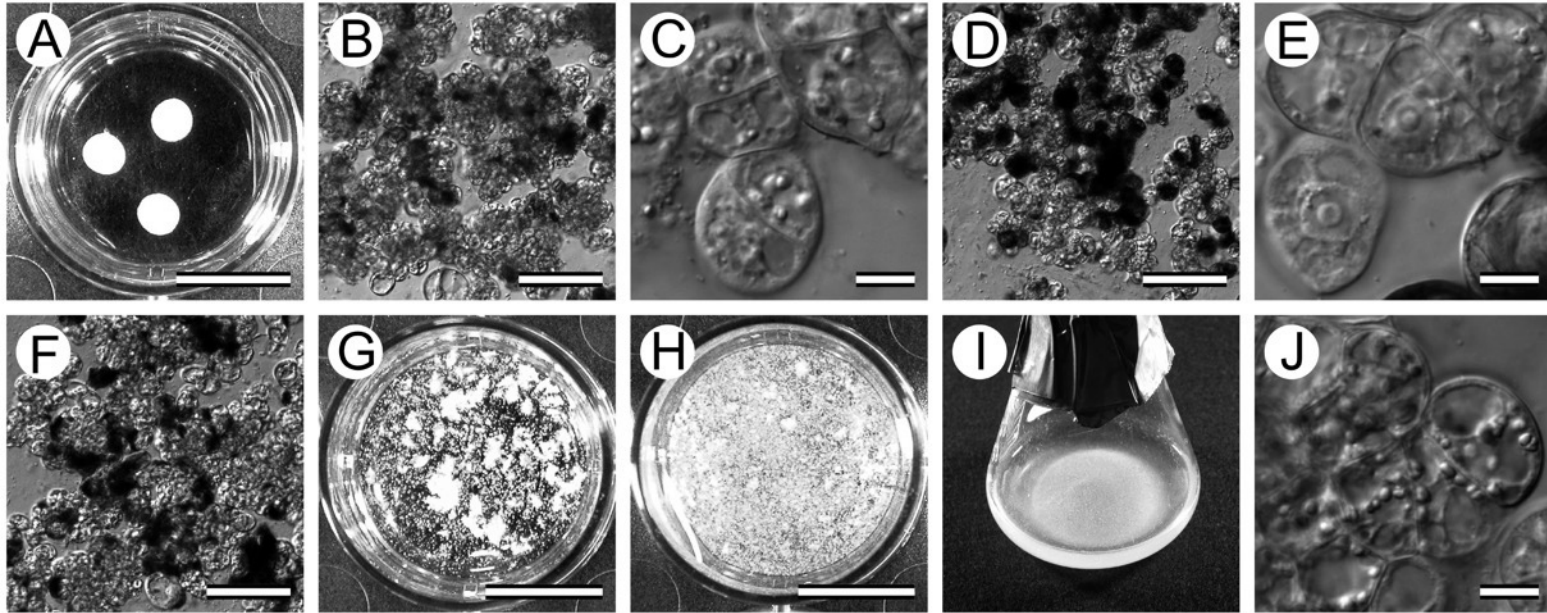
^a ビーズ簡易予備凍結法で保存

^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 川原・菅原・小林(正) (未発表)

シロイヌナズナ WsL45



A: アルギン酸ビーズ

G: ビーズ破碎 (3日目)

B, C: 保存前

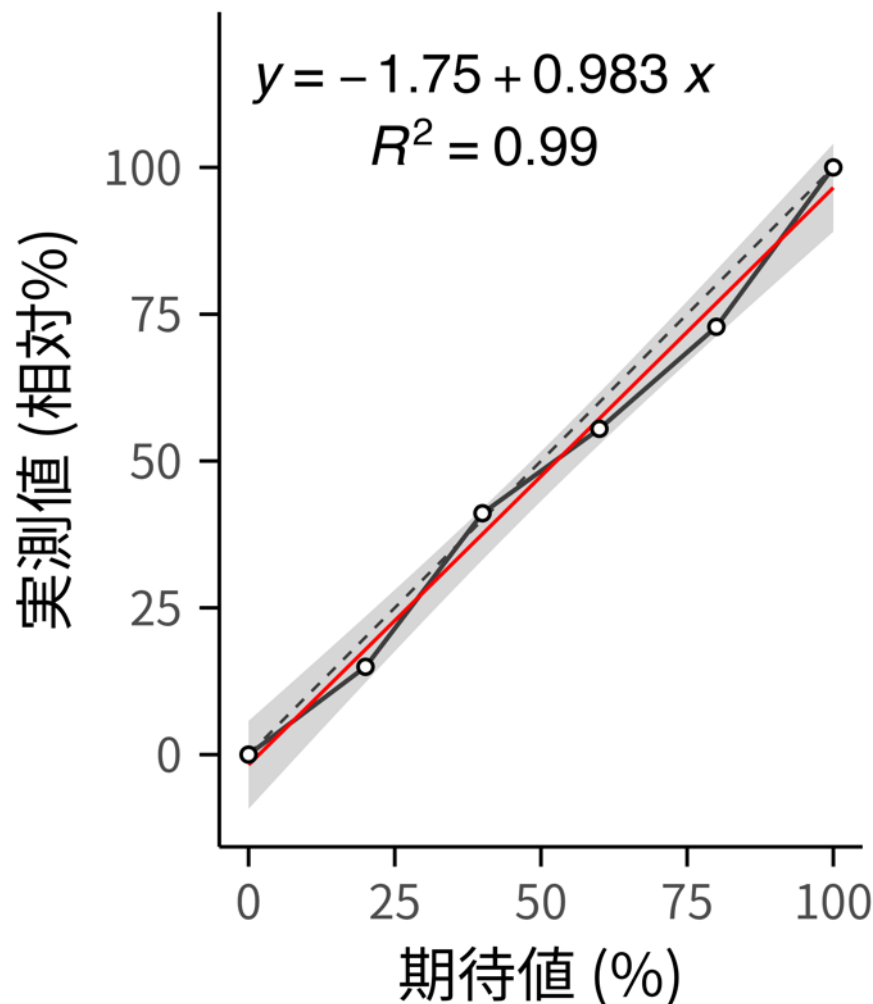
H: 7日目

D, E: 1日目

I, J: 移植7日目 (14日目)

F: 3日目

細胞生存率の測定 (TTC還元法)



ビーズ数* (生:死)	期待値 (%)	実測値 (相対%)
0:5	0	0
1:4	20	14.9
2:3	40	41.1
3:2	60	55.5
4:1	80	72.9
5:0	100	100

*シロイヌナズナWsL

生: 無処理ビーズ

死: 無処理ビーズを凍結