

Sf9昆虫培養細胞の培養方法及び保存方法 (Baculovirus Expression System)

文責: Ai Kametaka(+ H.Masuda)

更新日: 2002.06.18

【Sf9細胞の培養方法】

- Sf-900 II SFM (Invitrogen life technologies製)の液体培地を使用する。非働化*したFBSを5%加え、ペニシリンとストレプトマイシン(溶解したストック液を-30度冷凍保存)を50 U/mlで加える。以下の「液体培地」はこれを指す。(4℃冷蔵保存) Sf-900 II SFM の代わりに、TNM-FH培地を使ってもよい(こちらの方が一般的)。作り方は後述。
- 75 cm²のプラグシールキャップのカルチャーフラスコ(Coming製)を寝かせ、15 mlの液体培地中で培養する。フラスコは5~6経代くらい同じものを続けて使用して構わない。
- 27℃のインキュベータは、第2実験室の上段の機器を使用する。
- 底面に細胞が強固に付着するので、パッセージの際は手首のスナップを利かせて激しくフラスコを叩いて(泡立つが...)遊離させる。培養室に専用のクッションがあるので手が痛い場合は使用する。
- 3~4日毎にコンフルエントになるので、およそ5分の1の細胞を経代する。4日ごとの経代には、75 cm² フラスコ (15 ml培地) に 4.3~4.5 x 10⁶ 細胞、3日ごとの経代には、6 x 10⁶ 細胞を植え継ぐ。30回ほど繰り返して経代したら、新しい細胞のストックを起こして使用する。起こしてから数回経代をして増殖速度を安定させて実験に用いる(GIBCOのmanualではSf9細胞のダブリングタイムは72時間とされているが、現在labで使っている細胞のダブリングタイムはSf-900 II SFMを用いた培養で、約24時間)。

*血清の非働化: 血清を完全に融解し、攪拌、混和。56℃の水槽に30分間置く。水位は血清の高さより高くする。5分毎にボトルを攪拌して血清を混ぜ合わせ、均一に加熱する。

0. 冷蔵保存していた液体培地を27℃のウォーターバスで予め温めておく。
1. フラスコの蓋をはずし、ロングパスツールを用いて壁から静かに液体培地を吸引する。
2. フラスコに新しい液体培地を10 ml注ぎ、しっかりと蓋をして上記のように力強く細胞をはがす。顕微鏡で遊離したことが確認できるまで行う。
3. フラスコからピペットで細胞懸濁液を50 ml FALCONチューブに移す。
4. フラスコに新しい液体培地を13 ml注ぎ、3. のうちの2 mlを加えて蓋をする。
5. 細胞をやさしく攪拌し均一にしたら、27℃のインキュベータに入れる。

【Sf9細胞の凍結保存方法】

1. 増殖速度が一定になった細胞(できれば、生存率が90%以上)を、なるべく経代数の少ない時に凍結する。1 tubeあたり1 x 10⁷細胞を凍結するので、2~3個のフラスコを準備する。80-90% confluentになるまでフラスコ内で培養。細胞経代時と同じ方法で細胞をはがして、細胞数をcountする。
2. 遠心で細胞を集め、Sf-900 II SFM + 30%FBSに~1.1x10⁷細胞/mlになるように懸濁。DMSOを1/9 vol(final 10%)加えて、懸濁。
3. cryovialに1mlずつ分注。
4. 発砲スチロールでcryovialを覆い、-20℃で1時間。-80℃に移して、1-3日。
5. -150℃ freezerでcryovialを保存。

【Sf9細胞の起こし方】

1. -150℃ freezerからcryovialを取り出す。37℃のwater bath中でvialを緩やかに振りながら、細胞がほとんど溶けた状態になるまで、暖める。(37℃に長く置かない。細胞が死ぬ。)

2. vialをwater bathから取り出し、70% ethanolでvialの外側を滅菌。(氷上に置く)。
3. 25 cm²フラスコに4 mlの液体培地を加えて、前もって表面を培地でぬらしてから、vial中の細胞を加える。やさしく攪拌。
4. 27°Cのインキュベータに入れて、30-40分間、細胞が接着するのを待つ。
5. 培地を取り除き、新しい液体培地を5 ml加える。27°Cインキュベータへ。
6. 24時間後、培地交換。
7. Confluentになったら、75 cm²フラスコに植え継ぐ。

添付資料: 「Growth and Maintenance of Insect Cell Lines」Invitrogen life technologies社

「Bac-to-Bac Baculovirus Expression Systems」Invitrogen life technologies社

「ProBond Resin」Invitrogen life technologies社

【TNM-FH培地の作り方】

Grace's Insect Medium (GIBCO)	185.2 g
NaHCO ₃	1.4 g
Yeastolate (DIFCO)	13.3 g
Lactoalbumin hydrolysate (DIFCO)	13.3 g
DDW	~3.9 litre

Dissolve, and adjust pH to 6.0 with 10N NaOH

Add H₂O to make 4 litre

Fiter-sterile (using 0.22 um filter)

Store at 4 C

Add antibiotics and 1/10 vol. of heat-inactivated FCS (final ~10%)