

C.elegans の primary culture

2002 / 10 石原 健 (国立遺伝学研究所)

Christensen M, Estevez A, Yin X, Fox R, Morrison R, McDonnell M, Gleason C, Miller DM 3rd, Strange K.

A primary culture system for functional analysis of C. elegans neurons and muscle cells.

Neuron. 2002 Feb 14;33(4):503-14.

このプロトコールでは、この論文の方法をほぼそのまま行っています。

試薬など

Chitinase sigma C6137 1u/ml になるように Egg buffer に溶かし-20 保存

Peanut lectin sigma L0881 0.5mg/ml になるように水に溶かし-20 保存

Lectin 溶液をスライドグラスチャンバー(Iwaki, Nunc など。滅菌したカバーガラスや普通のプラスチックシャーレも同様の操作をすれば培養可能。)に入れ 20 分処理後、液を除いて UV 照射下風乾する。Lectin 溶液は、再使用可能。

Egg buffer (118mM NaCl, 48mM KCl, 2mM MgCl₂, 2mM CaCl₂ 25mM Hepes pH7.3)

L15 medium (Invitrogen) + 15mM sucrose+10%FCS+antibiotics

FCS のロットはあまり気にしなくて良いようです。

36% sucrose

0.5M NaOH+1%NaClO

S-basal

線虫の培養

1. 6cm rich plate (x4 pepton) 約 5 枚を 100ml の S-basal/OP50(or NA22)で培養 (20、約 3 日)。餌がほぼなくなった状態で、親虫を集める。(ステージは特にそろえなくても良い。)
2. 50mlIPP tube にいれて、室温で 5 分ほど放置。上清を捨てて、一度 S-basal で同様に洗う。

卵の調製

1. S-basal にサスペンドした虫を 1.5ml チューブに移す。しばらく放置して、上清を捨てる。
虫の体積が約 250 μ l くらいになるようにする。

2. 0.5M NaOH/1%NaClO を等量加え、時々Vortex しながら 4-6 分程度処理する。顕微鏡で見て、虫が全てこわれはじめ、親のからだの形が少し残っているくらいが良い。
3. 0.8ml の Egg buffer を加え、3000rpm30sec 遠心し、上清を捨てる。Egg buffer 0.5ml を加え、18G の針を付けた注射器を出し入れして、親の体をこわす。
4. 3000rpm 30sec 遠心し、上清を捨てる。もう一度洗う。
5. 遠心したペレットに 4 倍容の 36% sucrose を加えよく混ぜる。そこに Egg buffer を 300 μ l 上層する。
6. 3000rpm 3min 遠心し、界面に集まった卵を別の tube に移し、Egg buffer で 2 回洗う。

Chitinase 処理と得られた細胞の培養

1. 得られた卵に 1u/ml chitinase を加え (約 5-10vol) 時々混ぜながら室温で約 40-60 分処理する。
2. 40 分後くらいからは 200 μ l チップでピペッティングして、細胞をバラバラにする。
3. 大部分の卵の殻がはずれたら、1ml の培地を加え 3000rpm 3min 遠心する。
4. 沈殿した細胞に 1ml の培地を加え、5 μ m PVDF filter(Millipore)でろ過して細胞以外のものを除く。filter は 3ml の培地で洗い、洗液をろ液と混ぜる。
5. 細胞数をカウントして、 2×10^5 /cm² 程度になるようにして lectin coat したスライドグラスチャンバーにまき、翌日まで 20 で培養する。大部分の細胞は、ガラス表面に接着し、一部の細胞は突起を伸張しはじめている。
6. 翌日に接着しなかった細胞を除くために、培地を交換する。

この状態で、1 週間以上生きています。

*Poly lysine コートしたスライドグラスより、lectin コートしたスライドグラスを利用した方が、突起を伸張する細胞の割合が高い。

*親虫約 1ml からスタートして、 $3-6 \times 10^6$ cells くらい得られる。