

# 遺伝子改変済みがん関連細胞株用のプロトコール

## 製造

Horizonの遺伝子改変済みがん関連細胞株は、社内で作製されたか、Horizonにライセンス供与されたものです。すべての遺伝子改変済みがん関連細胞株は、1mLの凍結培地中で $1 \times 10^6$ 個を超える凍結細胞を含む単一のバイアルとして提供されます。凍結培地の組成と正確な細胞数については、細胞株固有の分析証明書 (CoA) を参照してください。各遺伝子改変済みがん関連細胞株には、コントロールとして親細胞株も付属しています。ホライゾンの遺伝子改変済みがん関連細胞株は、生物学的セーフティーレベル1 (BSL-1) です。

## 出荷および保管

Horizonの遺伝子改変済みがん関連細胞株は、ドライアイスで出荷されます。輸送中にCO<sub>2</sub>がバイアルに入るのを防ぐための予防措置が講じられていますが、受け取ったら、細胞を液体窒素で2日以上保管して、CO<sub>2</sub>を放散させることをお勧めします。液体窒素貯蔵庫からバイアルを取り出すときは、室温で約30秒以上放置して、液体窒素がバイアルから放散されるようにします。注：液体窒素で保管されたバイアルを取り扱うときは、常に保護眼鏡と手袋を着用してください。

## 品質管理

遺伝子改変済みがん関連細胞株は、バンク後の解凍と培養によって生存率がテストされ、トリプシン大豆とチオグリコレートブロスへの直接接種によって無菌性がテストされ、マイコプラズマ汚染がないことが確認されています（詳細については、細胞株固有のCoAを参照してください）。がん関連細胞株は、ゲノムレベルでの変異を確認するために、PCR増幅とサンガーシーケンシングによって検証されています。プライマー配列は細胞株特異的CoA上に記載があります。

## 結細胞ストックから細胞培養を開始します（すばやく解凍します）

1. 遺伝子改変済みがん関連細胞株を液体窒素から取り出し、37°Cのウォーターバスに2分間入れて、ほぼ（～80%）解凍します。
2. バイアルから細胞を取り出し、あらかじめ温めた9 mLの細胞培養培地を含む15 mLコニカルチューブにゆっくりと加えます（付録の表1を参照）。
3. 300×gで3分間遠心分離して細胞をペレット化し、上清を取り除きます。
4. 2 mLの適切な細胞培養培地を追加し、あらかじめ温めた4 mLの細胞培養培地を含むT25フラスコに細胞を移します。

5. 細胞を5% CO<sub>2</sub>・37°C設定のインキュベーターに入れます。
6. 24時間後、培地を5～10 mLの適切な細胞培養培地と穏やかに交換し、5% CO<sub>2</sub>・37°Cで培養を続けます。

## 細胞の継代培養

目的のアプリケーションで使用する前に、少なくとも1回は細胞を継代することをお勧めします。以下に記載の継代培養プロトコールでは、標準的なT75細胞培養フラスコで細胞を継代する際の細胞培養ガイドラインおよび液量を説明しています。異なるフラスコを使用する場合は、メーカーのガイドラインに従って培養量を増減する必要があります。

### 付着性の遺伝子改変済みがん関連細胞株の培養

**細胞株：A375、Cal12T、DLD-1、EBC-1、HACAT、HCT-116、hTERT-HME1、hTERT-IMEC、hTERT RPE、LIM1215、MCF10A、NCI-H838、NCI-H1975、Panc 04.03、RKO、SW48、VACO 432**

細胞株は通常、70～90%がコンフルエントになったときに継代します。各細胞株のより具体的な詳細は、AppendixのTable 1に記載されています。

1. 細胞から増殖培地を注意深く吸引します。これは、フラスコまたはプレートを傾け、細胞表面に触れずに培地を除去することによって行うのが最適です。
2. 5 mL PBSで細胞を穏やかに洗浄し、残りの培地を除去します。
3. 適切な量のトリプシン-EDTA溶液（GIBCO、カタログ番号25300096）で細胞をトリプシン処理します。細胞がフラスコから離れるまで、フラスコを37°Cのインキュベーターに約2分間置きます。
4. 等量の推奨細胞培養培地（AppendixのTable 1を参照）でトリプシンを中和して、剥離した細胞を再懸濁します。
5. 培地の泡立ちを避けながら、細胞を10 mLピペットで約5回上下にピペティングして、単一細胞懸濁液を取得します。
6. 推奨される分割比（AppendixのTable 1）に従って、適切な細胞培養培地を含む新しい滅菌フラスコまたはプレートに細胞を播種します。細胞を5% CO<sub>2</sub>・37°C設定のインキュベーターに入れます。

## 浮遊性の遺伝子改変済みがん関連細胞株の培養

### 細胞株：K-562、NALM-6

細胞株は通常、 $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$  生細胞/mLの細胞密度で維持します。

1. 細胞が培地に均一に分布していることを確認し、細胞懸濁液から細胞の少量のサンプル (100  $\mu$ lなど) を注意深く採取し、セルカウンターを使用して生細胞の総数を決定します。
2. 目的の播種密度を達成するために必要な培養量は、次の式を使用して計算できます。

$$\frac{\text{新しいフラスコ中の総量 (ml)} \times \text{望ましい播種密度 (10e6)}}{\text{細胞数 (10e6)}}$$

3. 細胞懸濁液を新しい滅菌フラスコに播種するか、現在の培養液を必要な量の細胞培養液で希釈します (AppendixのTable 1を参照)。細胞を5% CO<sub>2</sub>・37°C設定のインキュベーターに入れます。

注：安定した成長が達成される前に、細胞は約1週間の遅延期間を経験する可能性があります。各々の遺伝子改変済みがん関連細胞は異なる倍加時間で増殖する可能性があり、親細胞株とはわずかに異なる形態を持っている可能性があります。

## 浮遊性の遺伝子改変済みがん関連細胞株の培養

### 細胞株：KMS-11

1. 浮遊している細胞を含む培地を、適切なサイズの遠心分離管に注意深く吸引します。
2. フラスコの表面積を覆うように適切な量のDPBSを加え、次にフラスコを穏やかに攪拌して細胞をすすぎ、DPBSを同じ遠心分離管に集めます。
3. 適切な量のトリプシン-EDTA溶液 (GIBCO、カタログ番号25300096) で細胞をトリプシン処理します。細胞がフラスコから離されるまで、フラスコを37°Cのインキュベーターに約2分間置きます。
4. 等量の推奨細胞培養培地でトリプシンを中和し (付録の表1を参照)、ステップ1の遠心チューブに細胞懸濁液を移します。
5. 200 gで3分間遠心分離し、細胞をペレット化します。
6. 上清を捨て、ペレットを適切な量の培地に再懸濁します。
7. 推奨される分割比 (AppendixのTable 1を参照) で、適切な細胞培養培地を含む新しい滅菌フラスコまたはプレートに細胞を播種します。細胞を5% CO<sub>2</sub>・37°C設定のインキュベーターに入れます。

## 細胞の凍結

### 附着性遺伝子改変済みがん関連細胞株の凍結

1. 細胞をトリプシン処理し、300  $\times$ gで3分間スピンドウンします。
2. セルカウンターを使用して細胞をカウントし、凍結用に必要な量の細胞を300 gで3分間スピンドウンします。
3. 45% RPMI基本培地 (または細胞株のCoAで指定された基本培地) + 50% FBS + 5% DMSOを含む凍結培地に細胞ペレットを再懸濁します。
4. 細胞懸濁液を適切なクライオバイアルに移します。
5. クライオバイアルを適切な凍結容器に移し、-80°Cで保存します。
6. 翌日、細胞を液体窒素に移します。

 技術的なヒント：凍結して、継代数の少ない細胞を使用することを強くお勧めします。

## 浮遊性遺伝子改変済みがん関連細胞株の凍結

1. セルカウンターでカウントした後、凍結用に必要な量の細胞を300gで3分間スピンドウンします。
2. 40% RPMI基本培地 (または細胞株CoAで指定された基本培地) + 50% FBS + 10% DMSOを含む凍結培地に細胞ペレットを再懸濁します。
3. 細胞懸濁液を適切なクライオバイアルに移します。
4. クライオバイアルを適切な凍結容器に移し、-80°Cで保存します。
5. 翌日、細胞を液体窒素に移します。

## 緩く附着または混合した遺伝子改変済みがん細胞株の凍結

1. 浮遊している細胞を含む培地を、適切なサイズの遠心分離管に注意深く吸引します。
2. フラスコの表面積を覆うように適切な量のDPBSを加え、次にフラスコを穏やかに攪拌して細胞をすすぎ、同じ遠心分離管にDPBSを集めます。
3. 適切な量のトリプシン-EDTA溶液 (GIBCO、カタログ番号25300096) で細胞をトリプシン処理します。細胞がフラスコから離されるまで、フラスコを37°Cのインキュベーターに約2分間置きます。
4. 等量の推奨細胞培養培地でトリプシンを中和し (AppendixのTable 1を参照)、ステップ1の遠心分離管に細胞懸濁液を移します。
5. 300gで3分間遠心分離し、細胞をペレット化します。
6. ペレットを適切な量の培地に再懸濁し、セルカウンターを使用して細胞株をカウントし、凍結用に必要な量の細胞を300gで3分間スピンドウンします。
7. 45% RPMI基本培地 (または細胞株CoAで指定された基本培地) + 50% FBS + 5% DMSOを含む凍結培地に細胞ペレットを再懸濁します。
8. 細胞懸濁液を適切なクライオバイアルに移します。
9. クライオバイアルを適切な凍結容器に移し、-80°Cで保存します。
10. 翌日、細胞を液体窒素に移します。

## よくある質問 (FAQ)

### 1. 推奨される細胞密度を超えるとどうなりますか？

最大推奨密度を超えると、細胞の健康と生存率に影響します。細胞密度を超える場合、ベストプラクティスは新鮮なストックから始めることです。

### 2. 遺伝子改変済みがん細胞株には野生型コントロールが付属していますか？

細胞株は同質遺伝子ペアとして提供されます。遺伝子改変された細胞株と元の野生型親株。

### 3. CoAで抗生物質耐性が指定されている場合、遺伝子改変済みがん関連細胞株を選択して維持する必要がありますか？

遺伝子改変は永続的であり、細胞株はクローンであるため、細胞を選択して維持する必要はありません。

## Appendix

Table 1. Cell Culture Medium and Cell Line Maintenance tips

Cell name	Basal Medium	Supplements	Sub cultivation
A375	DMEM/F-12 (with 2.5 mM L-glutamine, 15 mM HEPES)	10% FBS 1% Pen/Strep	Split at 70-80% confluency, approximately 1:5-1:6
Cal12T	DMEM/F-12 (with 2.5 mM L-glutamine, 15 mM HEPES)	10% FBS 1% Pen/Strep	Split at 70-80% confluency, approximately 1:2-1:4
DLD-1	RPMI 1640 (with 2mM L-glutamine and 25mM sodium bicarbonate)	10% FBS 1% Pen/Strep	Split at 70-80% confluency, approximately 1:6-1:10
EBC-1	MEM (with 2mM L-glutamine and 25mM sodium bicarbonate)	10% FBS 1% Pen/Strep	Split at 70-80% confluency, approximately 1:4-1:6
HACAT	DMEM/F-12 (with 2.5 mM L-glutamine, 15 mM HEPES)	10% FBS 1% Pen/Strep	Split at 70-80% confluency, approximately 1:6-1:10
HCT116	RPMI 1640 (with 2mM L-glutamine and 25mM sodium bicarbonate)	10% FBS 1% Pen/Strep	Split at 70-80% confluency, approximately 1:10-1:20
hTERT-HME1	DMEM/F-12 (with 2.5 mM L-glutamine, 15 mM HEPES)	10% FBS 1% Pen/Strep 10 µg/mL insulin 20 ng/mL hEGF 0.5 µg/mL hydrocortisone	Split at 80-90% confluency, approximately 1:4-1:8
hTERT-IMECs	DMEM/F-12 (with 2.5 mM L-glutamine, 15 mM HEPES)	10% FBS 1% Pen/Strep 10 µg/mL insulin 20 ng/mL hEGF 0.5 µg/mL hydrocortisone	Split at 80-90% confluency, approximately 1:4-1:8
hTERT RPE-1	DMEM/F-12 (with 2.5 mM L-glutamine, 15 mM HEPES)	10% FBS 1% Pen/Strep	Split at 70-80% confluency, approximately 1:4-1:8
LIM1215	RPMI 1640 (with 2mM L-glutamine and 25mM sodium bicarbonate)	10% FBS 1% Pen/Strep 1 µg/mL insulin 1 µg/mL hydrocortisone	Split at 70-80% confluency, approximately 1:4-1:8. Medium change every 3-4 days.
MCF10A	DMEM/F-12 (with 2.5 mM L-glutamine, 15 mM HEPES)	5% horse serum 1% Pen/Strep 10 µg/mL insulin 20 ng/mL hEGF 0.5 µg/mL hydrocortisone 0.1 µg/mL cholera toxin	Split at 80-90% confluency, approximately 1:6-1:10
NCI-H838	RPMI 1640 (with 2mM L-glutamine and 25mM sodium bicarbonate)	10% FBS 1% Pen/Strep	Split at 70-80% confluency, approximately 1:12-1:20
NCI-H1975	RPMI 1640 (with 2mM L-glutamine and 25mM sodium bicarbonate)	10% FBS 1% Pen/Strep	Split at 70-80% confluency, approximately 1:10-1:12
Panc 04.03	RPMI 1640 (with 2mM L-glutamine and 25mM sodium bicarbonate)	10% FBS 1% Pen/Strep	Split at 70-80% confluency, approximately 1:2-1:6

## Appendix con...

Table 1. Cell Culture Medium and Cell Line Maintenance tips

Cell name	Basal Medium	Supplements	Sub cultivation
RKO	RPMI 1640 (with 2mM L-glutamine and 25mM sodium bicarbonate)	10% FBS 1% Pen/Strep	Split at 70-80% confluency, approximately 1:6-1:15
SW48	RPMI 1640 (with 2mM L-glutamine and 25mM sodium bicarbonate)	10% FBS 1% Pen/Strep	Split at 70-80% confluency, approximately 1:3-1:6
VACO 432	RPMI 1640 (with 2mM L-glutamine and 25mM sodium bicarbonate)	10% FBS 1% Pen/Strep	Split at 80-90% confluency, approximately 1:2-1:6
K-562	IMEM (with 2mM L-Glutamine and 25mM Sodium Bicarbonate)	10% FBS 1% Pen/Strep	Maintain at $1 \times 10^5 - 1 \times 10^6$ cells/ml
NALM-6	RPMI 1640 (with 2mM L-glutamine and 25mM sodium bicarbonate)	10% FBS 1% Pen/Strep	Maintain at $1.0-3.0 \times 10^6$ cells/ml, splitting approximately 1:6-1:10
KMS-11	RPMI 1640 (with 2mM L-glutamine and 25mM sodium bicarbonate)	10% FBS 1% Pen/Strep	Split at 70-80% confluency, approximately 1:4-1:6

### Abbreviation and catalog numbers:

DMEM/F-12: Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12 (Thermo Fisher, Cat. #31330-038)

FBS: Fetal Bovine Serum (Thermo Fisher, Cat. #10270-106)

IMDM: Iscove's Modified Dulbecco's Medium (Thermo Fisher, Cat. #21980-032)

MEM: Minimum Essential Medium (Thermo Fisher, Cat. #31095-029)

Pen/Strep: Penicillin/Streptomycin

RPMI1640: Roswell Park Memorial Institute Medium (Thermo Fisher, Cat. #21875-034)

### For more information

ホライゾン・ディスカバリー株式会社  
[horizondiscovery.com/contact-us](https://horizondiscovery.com/contact-us)

©2023 Horizon Discovery Group Ltd and its affiliated companies. All rights reserved. Revvity is a trademark of Revvity, Inc., registered in the United States and other countries. Horizon Discovery is a trademark of Horizon Discovery Ltd. Dharmacon is a trademark of Dharmacon, Inc. All Revvity, Inc., Horizon Discovery Ltd and Dharmacon, Inc. trademarks are used with permission. Other product names and brand names may be trademarks or registered trademarks of their respective owners.

本文書は英語版プロトコルを元にした日本語版です。内容は英語版の最新バージョンとは異なることがあります。

B057-2212-v2

