

## HEK293T細胞株の取り扱い

Catalog#: HCL4517

### 製造

HEK293T細胞株は、1 mLの凍結培地（10%DMSOを含む—使用前にSDSを確認してください）中に約 $1 \times 10^6$ 個の凍結細胞を含む単一のバイアルとして提供されます。

### 配送と保管

Dharmacon™ HEK293T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

HEK293T細胞は生存率がテストされ、マイコプラズマ汚染がないことが確認されています。

### HEK293T細胞を培養するためのプロトコール

Hyclone™ HEK293T培養培地の成分（Table 1）

Table 1. Dharmacon™ HEK293T 培養培地

Reagent	Amount for 1 L of HEK293T Culture Medium	Final Concentration	HyClone Cat#
DMEM High Glucose, + Sodium Pyruvate (110 mg/L), no L-glutamine	870 mL	N/A	SH30285.02
L-glutamine (200 mM)	30 mL	6 mM	SH30034.01
Fetal Bovine Serum	100 mL	10%	SH30070.03
Penicillin (10,000 U/mL) /Streptomycin (10,000 µg/mL)	10 mL	100 U/mL/100 µg/mL	SV30010

### 凍結細胞ストックからの細胞培養の開始 (すばやく解凍します)

1. HEK293Tパッケージング用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10 mLのHyclone HEK293T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。
3. 1000×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. 14 mLのHyclone HEK293T培養培地を加え、細胞をT25フラスコまたは100 mm培養皿に移します。
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14 mL HEK293T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。細胞は、約2～3日でT175フラスコへの継代または増殖の準備ができています。例については、FAQセクションの画像を参照してください。



HEK293T細胞は培養皿の表面から簡単に剥がれるため、培地を交換するときや洗浄中は細胞を優しく扱ってください。

### 細胞の維持

1. 新鮮なHEK293T培養培地は、3日ごとに、または細胞の増殖速度に応じて細胞に添加する必要があります。
2. HEK293T細胞はプレートから簡単に剥がれるため、常に非常に穏やかに処理する必要があります。
3. 適切な量の予熱したHEK293T培養培地を細胞に加えます。細胞に栄養を与える前に、まず細胞をPBS（HyClone Cat# SH30028.03）または培地ですすぐ必要がある場合があります。



これは通常、解凍後に予想されるように、培養物に死細胞または破片が多数ある場合に行われます。

4. 細胞を5%CO<sub>2</sub>・37°C設定のインキュベーターに戻します。

## 細胞の継代培養/継代

目的のアプリケーションで使用するために、細胞を少なくとも3回継代してください。レンチウイルスパッケージについては、当社のWebサイトにあるDharmacon Trans-Lentiviral Packagingテクニカルマニュアルを参照してください。

1. HEK293T細胞は通常、一般的な維持のためには、80%コンフルエントになったとき1:10から1:20の比率に継代されます。



細胞はより小さな比率で継代することができますが、その後より速くコンフルエントに到達し、より頻繁に継代する必要があります（たとえば1:5）。ウイルスパッケージングアプリケーションには、4:5または1:1の比率をお勧めします。

2. 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。
3. 細胞をPBSで穏やかに洗浄します。
4. 適切な量のトリプシン（HyClone Cat #SH30042.01）で細胞をトリプシン処理します（Table 2）。細胞がプレートから離れるまで、プレートを37°Cのインキュベーターに約2分間置きます。
5. 細胞培養容器に適切な量のHEK293T培養培地を加えて細胞を再懸濁し、トリプシンを不活化します。
6. 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。
7. 細胞を新しい滅菌フラスコまたはHEK293T培養培地を含むプレートに播種します（Table 3）。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。

Table 2. 日常的に使用される容器に必要なトリプシン細胞剥離液と再懸濁液の量

Cell culture vessel	PBS wash (mL)	Trypsin (mL)	Resuspension cell growth (mL)	Recommended volume in new flask (mL)
T-25 or 100 mm	2.5	1	5-10	5-10
T-150	10	2	10	30-40
T-175	10	2	10	35-50

Table 3. 日常的に使用される容器に必要なトリプシン細胞剥離液と再懸濁液の量

Flask type	Growth area per well (cm <sup>2</sup> )	Volume growth per well
T-175	175	30-50
T-150	150	30-40
100 mm dish	55	10
T-25	25	10
6-well	9.5	3
12-well	4	2
24-well	2	1
48-well	1	0.5
96-well	0.32	0.1
8-Well chamber	0.8	0.4

## よくある質問

Dharmacon™ HEK293細胞以外の細胞をパッケージングに使用できますか？

はい、レンチウイルスのパッケージングには標準のHEK293T細胞を使用できます。高いウイルス力価の産生を促進するために、SV40ラージT抗原を安定して発現する細胞株を使用することをお勧めします。SV40ラージT抗原を含まない細胞株を使用すると、力価が低下します。

細胞をプレーティングした後、大量の細胞死が見られます。上記の推奨事項に従うと、細胞はどのように見えるでしょうか？

24 hours, before wash (100 mm dish)



24 hours, after wash (~ 70% recovery)



48 hours



96 hours



For more information

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

©2022 Horizon Discovery Group Ltd and its affiliated companies. All rights reserved.

PerkinElmer is a trademark of PerkinElmer, 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 PerkinElmer, 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。内容は英語版プロトコルの最新バージョンとは異なることがあります。

B056-2212-v1

**horizon**  
a PerkinElmer company