

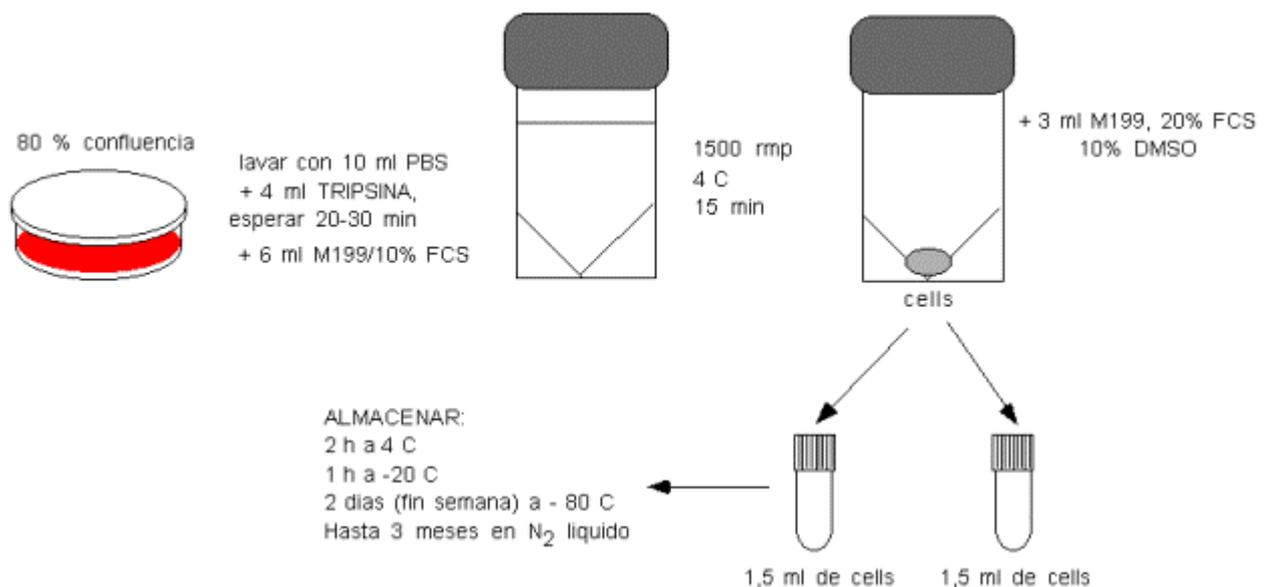
## Preparación de stocks de células MDR para almacenar en N<sub>2</sub> líquido.

### **TRABAJAMOS EN CONDICIONES DE ESTERILIDAD (CABINA DE FLUJO LAMINAR)**

- 1) Lavar cada placa (MDR1 y control, estamos pensando en células CHO) de células que ha llegado +/- al 80 % de confluencia con 10 ml de PBS estéril.
- 2) Añadir por placa 4 ml de TRIPSINA y esperar 20-30 min para que las células se despeguen de las placas.
- 3) Añadir 6 ml de alpha-MEM/10 % FCS.
- 4) Transferir en la cabina a un tubo estéril cada tipo de células.
- 5) Centrifugar a 1500 r.m.p., 4 °C , 15 min.
- 6) Eliminar el sobrenadante en la cabina de flujo laminar, usando una pipeta pasteur y succión automática.
- 7) Resuspender las células de cada tubo en 3 ml de medio alpha-MEM + 10% DMSO + 20% FCS.

Preparar con antelación a su uso 15 ml:	100%
Medio cultivo [alpha-MEM]: 10,5 ml	70%
FCS: 3,0 ml	20%
DMSO: 1,5 ml	10%

- 8) Transferir 1,5 ml de células a un criotubo convenientemente etiquetado, o sea, 2 criotubos por placa circular.
- 9) Almacenar estas células:
  - \$ a -80 °C, hasta 3 meses.
  - \$ en N<sub>2</sub> líquido, hasta 1 año.



## Preparación de stocks de células K562 WT y ADR+

### *Protocole pour la congélation des cellules.*

A chaque manip on ne se sert pas d'une nouvelle ampoule congelée, mais les ampoules servent a avoir des nouvelles cellules tous les 20 passages environ.

- 1) Pour congeler 1 ampoule, il faut 5 à  $6 \cdot 10^6$  cellules soit environ les cellules contenu dans un flasks de 5ml à J4.
  - 2) ce n'est pas la peine de laver avec du PBS, car c'est mieux de garder un milieu avec du serum,
  - 3) on centrifuge les cellules pour enlever le milieu ancien (1 000 rpm, 10 min)
  - 4) reprendre le culot avec le milieu pour congélation (RPMI + 10% DMSO + 20% SVF) avec 1ml pour 1 ampoule donc pour 5 à  $6 \cdot 10^6$  cellules.
  - 5) transférer très rapidement dans les ampoules à congélation (cryotubes) (1ml par tube)
  - 6) placer le plus rapidement possible au congélateur  $-80^\circ$  ou dans l'azote liquide.
- Ne pas laisser non congelé,  $25^\circ$  ou  $4^\circ$ , car le DMSO est très toxique pour les cellules. Peut être garder plusieurs mois à  $-80^\circ$  et plusieurs années dans l'azote

*Pour décongeler :*

- 1) Préparer un tube à centrifuger stérile avec 10mL de milieu (RPMI +10% SVF)
  - 2) décongeler l'ampoule en la basculant dans un bain marie à  $37^\circ$ . Arrêter dès qu'il ne reste qu'une petite pointe de glace
  - 3) transférer dans le tube de milieu (pendant ce temps le dernier glaçon a fondu) : le but est de laisser les cellules aussi peu de temps possible dans le DMSO.
  - 4) centrifuger, reprendre le culot dans 5ml de milieu et les placer dans un flask de culture de 25cm<sup>2</sup>
  - 5) au bout de 2 jours ou plus si nécessaire, en surveillant que les cellules sont belles, passer au taux de  $10^5$  cellules par ml et passer tous les 4 jours. N'utiliser les cellules qu'après 2 passages et les utiliser à J2 pour les manip.
- 

Last update, 10.26.2001