

## Preparación de cultivos celulares con fenotipo MDR.

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

#### ***MATERIAL NECESARIO:***

Para cultivar células LLC-PK1 (MDR y control) usamos **Medium 199 with earle's salt**. GIBCO BRL. N Cat 31150-022. Life technology. Para cultivar K562 (línea celular de leucemia humana) usamos RPMI 1640 (Sigma) y para cultivar CHrB30 usamos **alpha-MEM** (Ref. 11900-073, power o 22571-038, liquid). Siempre suplementado con 10 % de FCS [Fetal Clone I : Bovine Serum Product. Optimized from hibridomes. N Cat SH30080.03. HyClone Laboratories Inc].

Además necesitamos:

CHrB30 cells. Cabina de flujo laminar. Guantes de látex y etanol al 70 % para lavar. Pipetas de plástico de 1, 5, 10 ml estériles. Pipeta automática para succión. Botellas estériles de 75 cm<sup>2</sup>. Colchicina 10 µg/µl. 5000 U/ml penicilina/estreptomicina. Incubador a 37 °C y 5 % de CO<sub>2</sub>.

El medio de cultivo se suplementa con 10 % de FCS, para 500 ml de medio se añade 50 ml de FCS. Esto se hace en cabina. Las botellas de FCS son de 1L y es necesario hacer alícuotas de 50 ml, volcando en tubos frente a la llama. Estas se almacenan a - 20 °C.

Antes de comenzar a preparar el cultivo o de duplicar las placas es **MUY IMPORTANTE** atemperar el medio + 10 % de FCS, la tripsina y el PBS estéril a 37 °C; usando un baño de agua. Igualmente hacemos con un criotubo de células si queremos iniciar el cultivo.

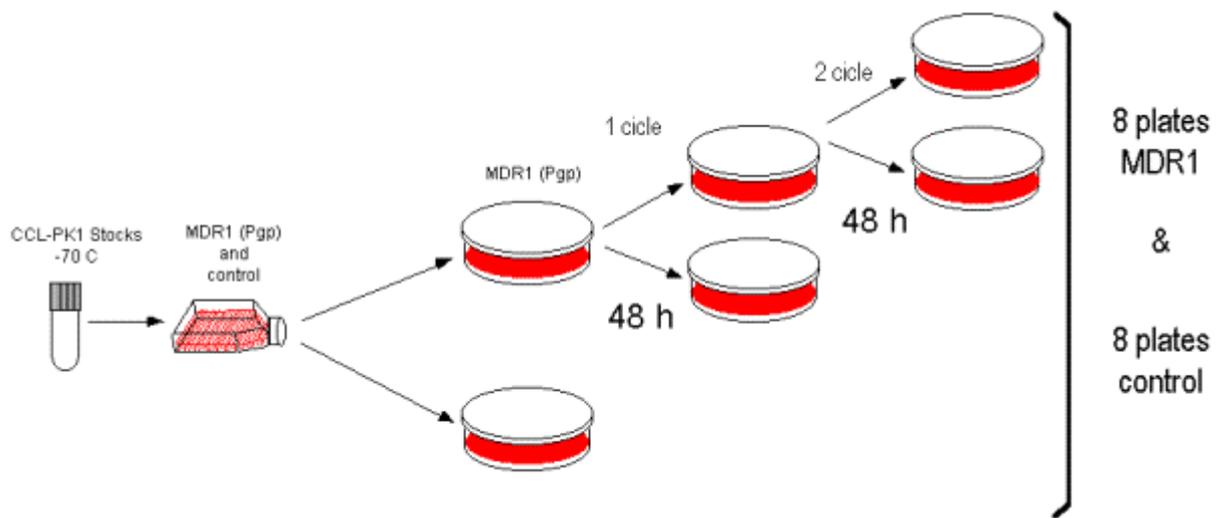
En la sala de cultivo trabajamos con guantes y nos lavamos con cierta frecuencia con etanol al 70 %.

Observamos al microscopio que las células que están creciendo en nuestras placas han llegado a confluencia, entonces debemos llevar a cabo un **NUEVO PROCESO DE SIEMBRA**.

#### **SIEMPRE EN CABINA DE FLUJO LAMINAR**

1. Retiramos el medio viejo con una pipeta estéril.
2. Lavamos las células con 10 ml de PBS estéril y lo retiramos con una pipeta monouso de plástico.
3. Añadimos 5 ml de tripsina y guardamos nuevamente las placas a duplicar en el incubador durante unos 30 min para que las células pierdan su adhesión a la placa.
4. Pasado este tiempo podemos observar al microscopio que las células flotan en la disolución.
5. **Etiquetamos dos botellas nuevas y añadimos 14.5 ml de alpha-MEM + 10 % de FCS, 3.5 ml penicilina/stepomicina, 20 µl de colchicina y después 2.5 ml de células en cada una de las dos placas usadas para la duplicación.**
6. Colocamos las dos nuevas placas en el incubador a 37 °C y 5 % de CO<sub>2</sub> y esperamos una nueva confluencia (unas 20-30 horas).

**NOTA:** Podemos tener problemas en el cultivo con bacterias, hongos (ambos se ven a simple vista en la placa) y con micoplasmas. Periódicamente debe testarse la presencia de micoplasmas por PCR.



Last update, 02.08.2006