

U-251MG/Temozolomide(人神经胶质细胞瘤细胞替莫唑胺耐药株)

Human glioma cell line resistant to temozolomide

细胞介绍

通过外植技术衍生自恶性胶质母细胞瘤肿瘤。

细胞特性

- 1) 来源: U251 胶质瘤耐药筛选
- 2) 形态: 贴壁细胞
- 3) 含量: $>1 \times 10^6$ 细胞数
- 4) 用途: 仅供科研使用。

细胞运输、保存及注意事项: 干冰运输及复苏好存活细胞

(1) 1mL 冻存管包装干冰运输, 收到后-80 度冰箱保存过夜后转入液氮或直接复苏, 若发现干冰已挥发干净、冻存管瓶盖脱落、破损及细胞有污染, 请立即与我们联系。

(2) T25 瓶复苏的存活细胞常温发货, 收到后按照以下处理方法操作:

- 1、收到细胞请先就培养瓶/冻存管的外观、细胞的状态, 进行拍照并保存, 如有问题请及时联系我们;
- 2、收到的复苏细胞, 若有较多细胞飘起, 可能由于运输导致。请先置于 37℃ 细胞培养箱中静置 2~4h, 待细胞贴壁后再做处理;
- 3、复苏细胞充液培养基为不含药物的维持培养基, 收到细胞后请及时更换为完全培养基;
- 4、建议收到细胞后, 首先进行扩增, 并冻存部分细胞以备用。

细胞耐药诱导过程

待细胞生长稳定后, 开始倍增药物诱导剂量, 每个剂量保持至细胞可以稳定生长至汇合度达 50% 以上。递增药物浓度依次为: $0.125 \mu\text{g/mL}$, $0.25 \mu\text{g/mL}$, $0.5 \mu\text{g/mL}$, $1 \mu\text{g/mL}$, $2 \mu\text{g/mL}$, $4 \mu\text{g/mL}$, $8 \mu\text{g/mL}$, $16 \mu\text{g/mL}$ 。约 8 个月后, 细胞可在 $16 \mu\text{g/mL}$ TMZ 药物浓度下稳定生长, 视为耐药细胞株构建成功, 并命名为 U251 MG/TMZ。

细胞培养试剂的配制**1) TMZ 药物的配制及保存**

建议将 TMZ 药物配制成 16mg/mL 的母液: 即使用 1mL DMSO 溶液溶解 16mg TMZ 药物, 使其完全溶解。

注意: 可根据用量配置药物, 并将药物分装保存, 避免反复冻融导致药物失效。溶解后的 TMZ, 4℃ 保存 1 周, -20℃ 保存 1 个月, -80℃ 保存 6 个月。

2) 冻存液的配制

90% 优质胎牛血清+10%DMSO, 现用现配。

网址: www.hfwanwu.com

电话: 400-1016-218

地址: 合肥市蜀山区长江西路 248 号 11 层



3) 完全培养基的配制

成分	体积/浓度
优质胎牛血清	10%
双抗	1%
TMZ	0~16 μ g/mL
DMEM 培养基	补充至所需体积

细胞培养条件

气相：空气，95%；二氧化碳，5%；温度：37℃，培养箱湿度为70%~80%。

细胞处理

1) 冻存细胞的复苏

将含有1mL细胞悬液的冻存管在37℃水浴中迅速摇晃解冻，加入到含4~6mL完全培养基的离心管中混合均匀，1000rpm/min离心3~5min，弃去上清液。加入1mL完全培养基重悬细胞后，均匀铺于含6~8mL完全培养基的培养瓶(或皿)中，置于37℃恒温细胞培养箱中过夜培养。第二天显微镜下观察细胞生长情况，2~3day换液。

注意：

①细胞复苏过程中，不可使用含有药物的培养基。须在细胞完全贴壁，形态完全展开，生长状态稳定后，方可根据实验需要添加TMZ药物。若加药后细胞生长状态较为缓慢，可适当降低TMZ的浓度，或使用不含TMZ的完全培养基培养至细胞生长状态较好时，再更换为所需的TMZ浓度；

②建议复苏细胞时始终穿戴防护手套和面罩，避免冻存管因温差较大而发生爆炸，造成人员伤害。

2) 细胞传代（建议以同等底面积的培养瓶/皿按照1：2比例传代）

①待细胞密度达到80%~90%时，即可进行传代培养。

②弃去培养上清，用不含钙、镁离子的PBS润洗细胞1次，吸净残余的PBS。

③加入适当体积的0.25% (w/v) 胰蛋白酶-0.53 mM EDTA于培养瓶中(T25瓶-1mL，其它培养器皿可覆盖培养底面即可)，置于37℃培养箱中消化2~5min，显微镜下观察细胞大部分变圆并脱落，即可轻拍培养瓶使细胞全部脱落。迅速拿回操作台，加入2倍体积的、含10%FBS的培养基中止消化。

④将细胞悬液移入离心管中，1000rpm/min离心5min，弃去上清液。

⑤向细胞沉淀中加入1~2mL完全培养基重悬细胞，轻吹混匀。将细胞悬液按1：1的比例均匀铺于2个新的培养瓶/皿中，添加6~8mL完全培养基，置于37℃恒温细胞培养箱中培养。第二天显微镜下观察细胞生长情况，2~3day换液。

注意：细胞传代过程中，不可使用含有药物的培养基。须在细胞完全贴壁，形态完全展开，生长状态稳定后，方可根据实验需要添加TMZ药物。若加药后细胞生长状态较为缓慢，可适当降低TMZ的浓度，或使用不含TMZ的完全培养基培养至细胞生长状态较好时，再更换为所需的TMZ浓度。

3) 细胞冻存

①细胞冻存时，步骤同2)细胞传代的①~④，细胞计数后，加入配制好的细胞冻存液，重悬细胞，按照 $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$ 个细胞/mL分配到一个冻存管中，标注好名称、代数、日期等信息。



②将要冻存的细胞置于程序降温盒中，-80℃冰箱中过夜，之后转入液氮容器中储存。同时记录好冻存管在液氮容器中的位置以便后续查阅和使用。

使用范围

本产品仅限于科学研究，绝不可作为动物或人类疾病的治疗产品使用。

