



耐药株构建实验报告

一、实验器材及试剂

1、实验器材

名称	厂家	型号
立式冷藏柜	海尔	SC-332
台式高速冷冻离心机	湖南恒诺仪器设备有限公司	2-16R
超净工作台	苏净安泰	SW-CJ-1FD
CO2 细胞培养箱	Thermo	4131
PCR 仪	北京东胜创新生物科技有限公司	ETC811
ND-1000 分光光度仪	NanoDrop 公司	ND-1000

2、主要实验试剂及耗材

耗材	厂家	货号
1.5 ml 离心管	安徽科兔生物科技有限公司	KTL-15-W
2 ml 研磨管	安徽科兔生物科技有限公司	KTL-20-W
10 μ l 移液器	安徽科兔生物科技有限公司	KTY-10
100 μ l 移液器	安徽科兔生物科技有限公司	KTY-100
200 μ l 移液器	安徽科兔生物科技有限公司	KTY-200
1000 μ l 移液器	安徽科兔生物科技有限公司	KTY-1000
5000 μ l 移液器	安徽科兔生物科技有限公司	KTY-5000
T25	安徽科兔生物科技有限公司	KTP-25-T
胰酶	安徽科兔生物科技有限公司	RG-CE-18
PBS 缓冲液	安徽科兔生物科技有限公司	RG-RT-01
DMEM 培养基	安徽科兔生物科技有限公司	RG-CE-2
血清	安徽科兔生物科技有限公司	CG-SR-02
DMSO	碧云天	ST-038

二、实验步骤



- 1、亲本细胞准备：**选择状态良好、传代稳定的亲本细胞株进行实验。实验前观察细胞形态和生长状态，确认细胞无细菌、真菌及支原体污染。待细胞处于对数生长期时用于后续耐药诱导实验。
- 2、药物母液配制与保存：**按照药物说明书要求，用 DMSO、无菌水或其他适宜溶剂配制药液母液。母液经充分溶解后分装保存，避免反复冻融。实验使用时用完全培养基稀释至所需工作浓度，并设置相同溶剂比例的对照组。
- 3、亲本细胞药物敏感性检测：**在构建耐药株前，先采用 CCK-8、MTT 或其他细胞活力检测方法测定亲本细胞对该药物的敏感性，计算 IC₅₀ 或 IC₂₀。根据检测结果确定耐药诱导的初始药物浓度。
- 4、确定初始诱导浓度：**一般选择低于 IC₅₀ 的浓度作为起始诱导浓度，可参考 IC₂₀ 或 1/10–1/5 IC₅₀ 作为初始浓度。若细胞对药物较敏感，应从更低浓度开始，以减少一次性死亡过多导致细胞无法恢复。
- 5、低浓度药物诱导培养：**将状态良好的亲本细胞接种于培养瓶或培养皿中，待细胞贴壁并进入正常生长状态后，加入含低浓度药物的完全培养基进行诱导培养。培养过程中定期观察细胞形态、死亡情况和增殖速度，并按常规培养要求换液。
- 6、细胞恢复与传代：**药物处理后，细胞通常会出现增殖减慢、漂浮细胞增多或形态改变。当存活细胞逐渐恢复增殖，并可稳定生长至 70%–80% 融合度时，进行传代培养。若细胞状态较差，可维持当前药物浓度继续培养，不宜过快升高药物浓度。
- 7、逐步提高药物浓度：**当细胞在当前药物浓度下能够稳定生长 1–2 代后，逐步提高药物浓度。每次升高幅度可根据细胞耐受情况调整，一般以 1.2–2 倍递增为宜。若升高浓度后细胞死亡明显，应退回上一浓度继续培养，待细胞状态恢复后再尝试升高。
- 8、长期筛选与稳定培养：**持续进行药物递增诱导，直至细胞能够在目标药物浓度下稳定增殖。整个诱导过程通常需要数周至数月，具体时间取决于细胞类型、药物种类及耐药形成速度。
- 9、耐药株初步建立：**当细胞可在目标药物浓度下连续稳定传代 3 代以上，且细胞增殖状态相对稳定时，可认为耐药株初步建立。
- 10、撤药稳定性培养：**为判断耐药表型是否稳定，可将耐药细胞在无药培养基中培养 1–2 周，再进行药物敏感性检测。若撤药后仍保持较高耐药性，说明耐药表型相对稳定。
- 11、耐药性验证：**采用 CCK-8、MTT、克隆形成实验或流式凋亡检测等方法比较亲本细胞和耐药细胞对药物的反应。
- 12、冻存与后续使用：**对构建成功的耐药细胞进行冻存，建议冻存早期、中期和最终耐药株



细胞。后续实验使用前，应复苏细胞并重新确认其耐药性和细胞状态。

三、结果判读：

1、**细胞形态变化：**在药物诱导早期，细胞可能出现贴壁能力下降、细胞变圆、漂浮细胞增多、增殖速度减慢等现象。随着诱导进行，存活细胞逐渐适应药物压力并恢复增殖。若细胞可在较高药物浓度下保持稳定生长，提示耐药性逐渐形成。

2、**细胞增殖能力判断：**若耐药诱导后细胞在含药培养基中仍可稳定传代，说明细胞已对该药物产生一定适应性。若细胞长期无法恢复增殖，或每次加药后大量死亡，提示诱导浓度过高或递增速度过快。

3、**IC50 变化判断：**通过细胞活力实验比较亲本细胞与耐药细胞的 IC50。若耐药株 IC50 明显高于亲本细胞，说明耐药株构建有效。

4、**撤药后稳定性判断：**若耐药株撤药培养一段时间后，再次检测仍表现出较高 IC50，说明耐药表型相对稳定。若撤药后 IC50 明显下降，说明耐药性可能依赖持续药物压力，稳定性较差。

四、注意事项：

1、**亲本细胞状态必须稳定：**耐药株构建前应保证亲本细胞状态良好、传代次数适中、无污染。如果亲本细胞本身状态较差，会影响耐药筛选效率和结果稳定性。

2、**起始浓度不宜过高：**初始诱导浓度过高容易导致细胞大量死亡，无法获得稳定耐药细胞。建议先通过 IC50 或 IC20 检测确定合适的起始浓度，再进行长期诱导。

3、**升药浓度应循序渐进：**药物浓度递增不宜过快。若细胞在某一浓度下死亡明显，应维持该浓度继续培养，或退回上一浓度，让细胞恢复后再进行下一步诱导。