

Tripsinización de cultivos.

OBJETIVO:

Despegar las células del soporte en el que crecen manteniendo la viabilidad del cultivo.

Este protocolo utiliza una combinación de métodos:

- Químicos.
- Mecánicos.
- Enzimáticos.

REACTIVOS.

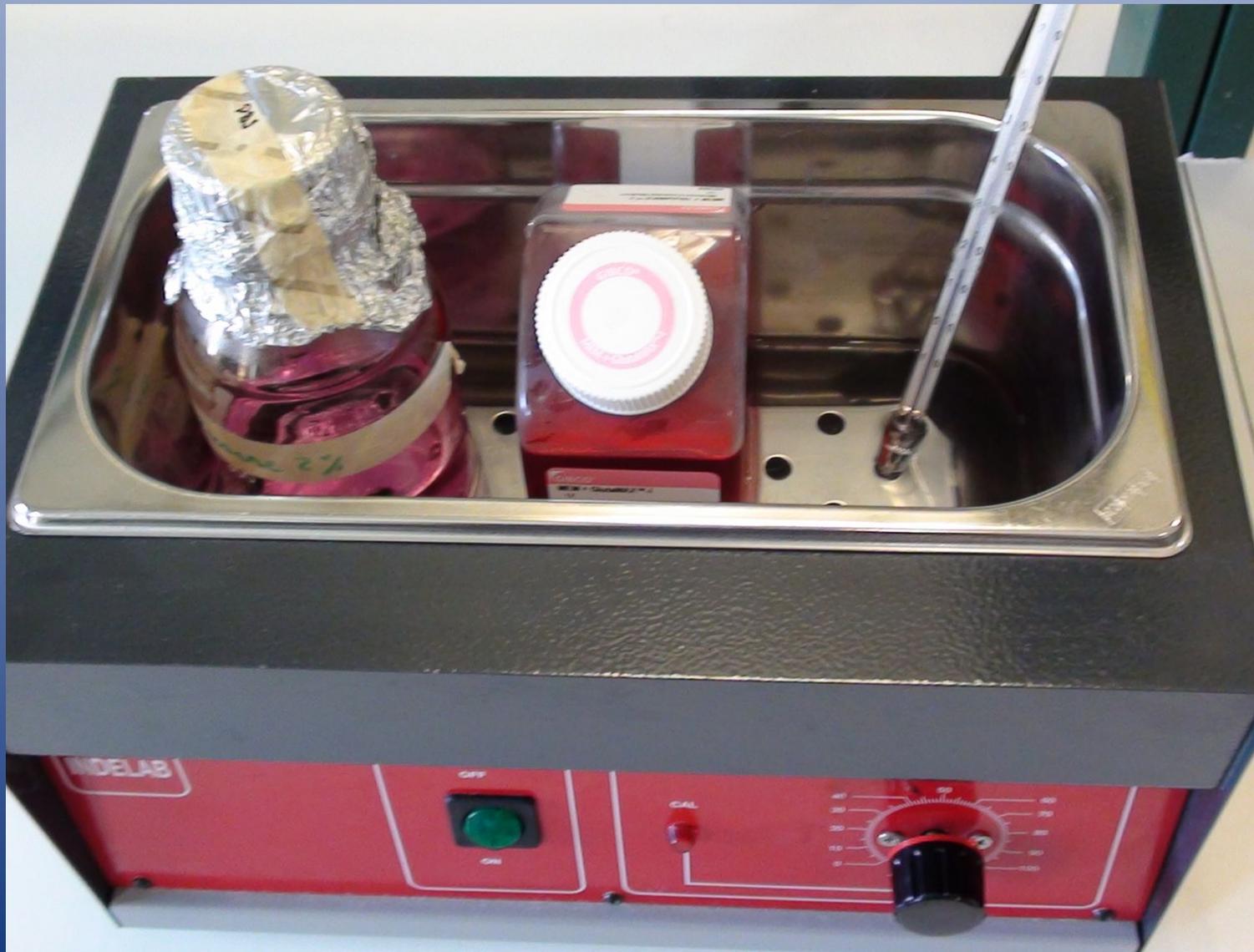
- 1. Solución de tripsina al 2,5% en PBS.
- 2. Solución de Versene (EDTA) al 2%.
- 3. EBSS (solución salina equilibrada de Earle).



Con estos reactivos se prepara la **solución de tripsinización:**

Versene (EDTA) al 2%..... 5ml
Tripsina al 2,5%.....4ml
llevar a 100 ml con EBSS .

ATEMPERAR REACTIVOS A 37 °C.



PROTOCOLO.

1. Retirar el medio MEM en el que han crecido las células. Con una pipeta Pasteur estéril.



2. Lavar la monocapa con un pequeño volumen de PBS (HBSS) a 37 °C.

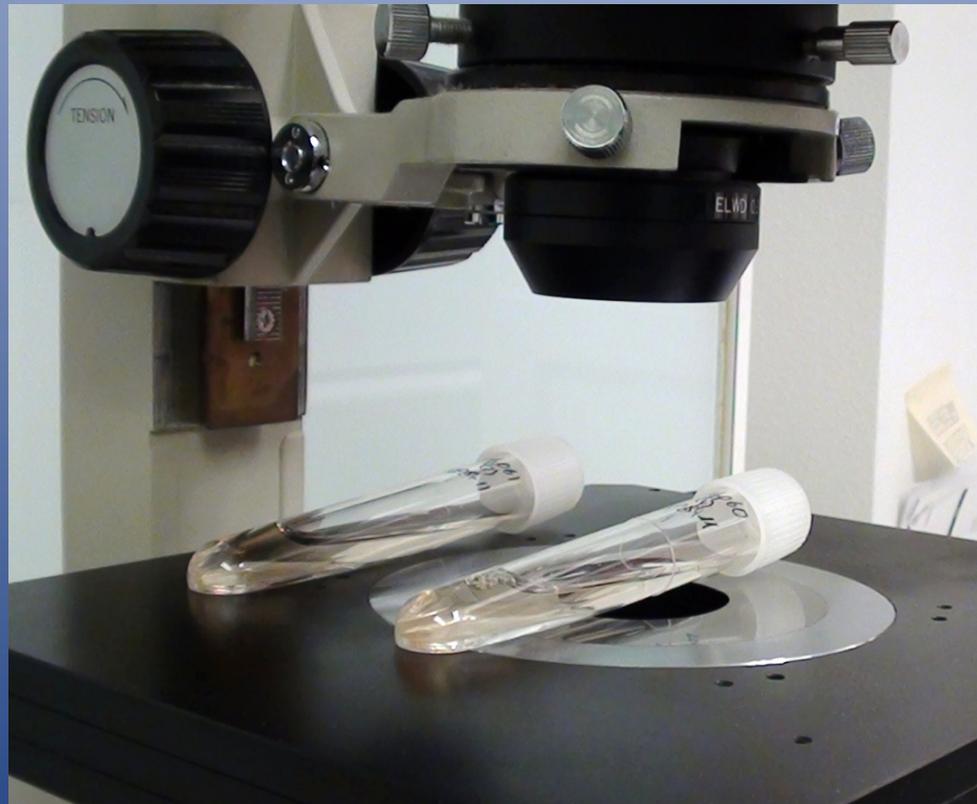
El PBS elimina el suero (FBS) residual que puede inhibir la acción de la tripsina.



3. Añadir suficiente solución de tripsinización a 37°C para cubrir toda la monocapa.

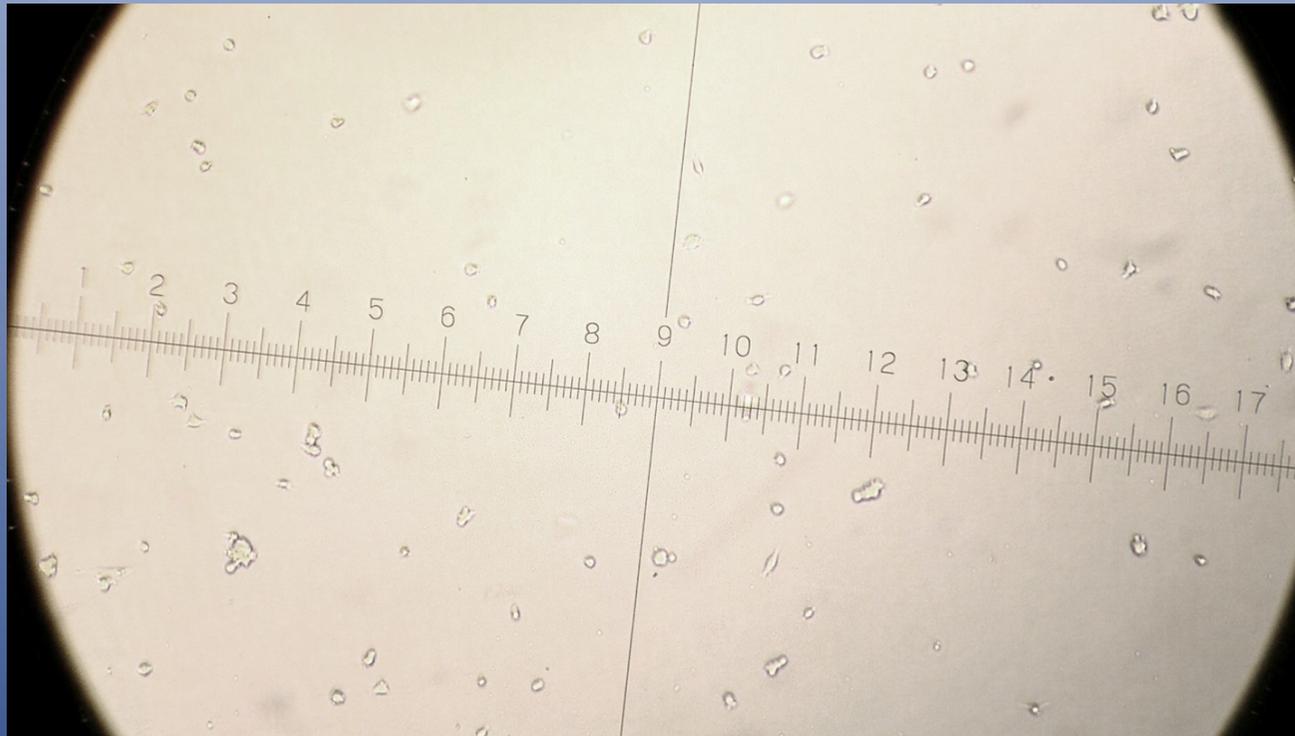
PROTOCOLO.

4. Colocar el frasco o el tubo bajo el microscopio invertido y comprobar que las células comienzan a desprenderse.



PROTOCOLO.

5. Incubar 5 minutos en la estufa a 37 °C para ver como se van despegando las células, dar golpecitos en el lateral del frasco para ayudar a que se despeguen.



Las células despegadas mostrarán este aspecto redondeado.

PROTOCOLO.

6. Cuando se comprueba que la mayor parte de las células se han despegado, se lleva el tubo o frasco a la cabina de flujo laminar.



PROTOCOLO.

Con una pipeta Pasteur estéril se hace chocar la solución de tripsina contra la superficie de cultivo varias veces para terminar de despegar todas las células.



PROTOCOLO.

Se debe conseguir que todas las células del cultivo estén en suspensión en el líquido.



PROTOCOLO.

7. Retirar aproximadamente la mitad del medio con las células y pasarlas a otro recipiente. Añadir en ambos medio fresco.



Este medio fresco inactivará la acción de la tripsina.

PROTOCOLO.

8. Homogeneizar bien la mezcla invirtiendo varias veces los tubos.



PROTOCOLO.

9. Volver a incubar los tubos en la estufa. La confluencia se volverá a alcanzar en 2 o 3 días dependiendo de la dilución realizada.

