

Trabajos Prácticos Dirigidos

Parte de este documento está tomado de Romero *et al.* “Métodos alternativos a la experimentación animal (Guía de prácticas)”. Ed. Diego Marín, Murcia (2005). ISBN: 84-8425-409-7

Profesorado:

Dr. Diego Romero García

Dra. Emma Martínez López

Dr. Antonio Juan García Fernández

Ldo. Alejandro Hernández García

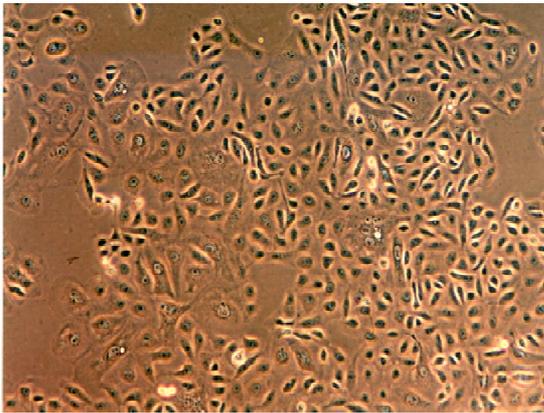
(Grupo de Investigación E008-12 Toxicología,

Sesión 5. Cultivos en monocapa (I). Subcultivo

El objetivo de esta práctica es la realización de un subcultivo a la línea celular que fue descongelada, sembrada, mantenida y estudiada en sesiones anteriores.

Material adicional: videos.

Pase o subcultivo. Una vez que los cultivos presentan alrededor del 80-100% de la confluencia en monocapa procederemos a la recogida de las células para utilizarlas, bien con el objetivo de aumentar la población de células (cultivo masivo), o bien para la realización de los ensayos. En ambos casos el protocolo a seguir será el mismo.



En primer lugar comprobaremos mediante el estudio microscópico el estado de las células, desechándose aquellos cultivos que no presenten un aspecto adecuado. Seguidamente eliminaremos el medio de cultivo de la misma forma que la indicada en la sesión 2, pero asegurándonos de no dejar resto alguno, para lo cual utilizaremos una pipeta Pasteur, aspirando el medio sin tocar la superficie de crecimiento de las células.

A continuación aplicaremos un tratamiento enzimático para romper las uniones de las células entre sí y entre éstas y la superficie de crecimiento. Para ello adicionaremos al frasco 5 ml de una combinación de tripsina-EDTA cuya concentración sea la adecuada al tipo celular. Esta operación se realizará en la cabina de flujo laminar, llevando inmediatamente el frasco de cultivo a un incubador cuya temperatura sea de +37°C, manteniéndolo aquí durante 10 minutos.

Una vez transcurrido este tiempo, se observará el estado del cultivo mediante el microscopio óptico. Se considera que las células se han despegado cuando éstas se observen redondeadas y flotando. Si no se aprecian de esta forma golpearemos el frasco suavemente con la mano. Si aún así las células no se despegan, volveremos a introducir el frasco en el incubador a +37°C, siendo el tiempo de permanencia variable en función de la proporción de células despegadas.



Seguidamente recogeremos la totalidad del contenido del frasco de cultivo mediante aspiración con pipeta Pasteur, pasándolo a un tubo de centrifuga, y añadiendo al mismo 5 ml de medio de cultivo fresco. Esta operación se realizará en el interior de la cabina de flujo.

Centrifugaremos a 1.000 rpm, a temperatura ambiente durante 10 minutos. Pasaremos el tubo a la cabina de flujo y eliminaremos el sobrenadante. Resuspender el sedimento en 2-3 ml de medio de cultivo fresco. Tomar una alícuota (100 μ l) y llevarla a un vial, adicionando otros 100 μ l de azul tripan. Homogeneizar la mezcla y comprobar el porcentaje de células vivas en cámara de recuento o por citometría de flujo (ver Sesión 1).

Subcultivo

Responda a los siguientes ítems:

Nivel de confluencia.....	Células viables (%)	} Azul tripán..... Citometría de flujo.....
Tripsina/EDTA		
Tiempo de tripsinización.....	Número de células total.....	
Células sueltas (%).....	Número de células sembradas.....	

Describe y dibuje el aspecto del cultivo antes de efectuar la tripsinización:

