

Quelques remarques et conseils pour la culture cellulaire

1. Organisation du poste de travail et déroulement du passage

1.1. Préparation avant manipulation

- changer de blouse en entrant en culture cellulaire
- enlever les bijoux et montre
- se laver correctement les mains et les avant bras (la blouse ne doit pas couvrir les avant bras comme en microbiologie puisqu'ils entrent dans le champ stérile généré par la hotte)
- décontaminer le plan sous la hotte sans oublier les grilles devant et au fond
- mettre en activité la hotte (sur S Louis Rhéostat réglé à 120) et penser à mettre la lumière.

1.2. Préparer le poste de manipulation

- réfléchir au nombre de pipettes nécessaires pour l'ensemble de la manipulation (pas de gaspillage inutile) et les rassembler de préférence à l'extérieur de la hotte
- mettre sous la hotte l'ensemble des solutions nécessaires à la manipulation (pour les TP : tampon PBS, Trypsine et DMEM complet) et ouvrir les différents bouchons (les mettre en attente derrière chaque bouteille de manière à ne pas avoir à passer au dessus pendant les manipulations)
- ne pas ouvrir et fermer les flacons à chaque fois et ne pas aller et venir à chaque nouvelle solution : on fera cela en fin de séance au moment de ranger.

1.3. La manipulation proprement dite

- aller chercher la boîte de culture dans l'étuve : fermer le bouchon (1/4 de tour) avant de quitter l'étuve.
- réaliser une observation de la culture :
 - décrire le tapis cellulaire, la densité de confluence, l'aspect des cellules
→ évaluer alors la pertinence du passage à ce moment.
 - décrire le milieu de culture: couleur (ind. pH), limpidité (abs. de contamination bactérienne, fongique), les éventuelles cellules en suspension (cellules mortes)
- puis aller sous la hotte (à partir de là plus de déplacement car tout est sous la hotte)
- éliminer le milieu par aspiration ou par versement direct (retourner la boîte de manière à ne pas laisser les déchets sur le tapis)
- rincer le tapis avec un volume conséquent de tampon sans Ca^{2+} si Mg^{2+} , napper bien l'ensemble de la surface.
- éliminer le tampon (même procédure que pour éliminer le milieu)
- ajouter la trypsine et fermer la boîte (étuver ou non)
- suivre régulièrement le décollement du tapis en observant à l'œil (apparition d'un voile opaque sur le fond avec des lambeaux sur les bords) ou au microscope
- durée de décollement entre 30sec à 2 - 3min (ne pas attendre que toutes les cellules soient isolées car risque d'altération : les derniers paquets seront dissociés par aspiration refoulement)
- préparer les nouvelles boîtes pendant la trypsination avec éventuellement le volume de milieu nécessaire pour le repiquage (on s'organise pour optimiser le temps) en laissant les boîtes ouvertes et verticales
- dès que la dissociation est suffisante arrêter rapidement la trypsine par ajout de milieu complet.
- aspirer et refouler en soufflant sur le tapis : les dernières adhésions cellulaires seront rompues, les paquets dissociés.
- transférer le volume de suspension mère nécessaire pour le repiquage dans les nouvelles boîtes.
- fermer les bouchons et étuver (penser à débloquer les bouchons une fois dans l'étuve : vérifier la température (37°C), la présence d'eau non contaminée dans la réserve d'eau et le taux de CO_2 de l'étuve (5%))
- refermer les différents flacons encore sous la hotte et les ranger.
- éliminer les déchets solides et liquides.
- décontaminer le plan de travail sans oublier les grilles d'aspiration et mettre en veille la hotte si elle doit resservir (Rhéostat 60).
- se laver les mains et sortir de la salle.

1.4. Quelques précautions :

- ne pas stocker les choses inutiles sous la hotte,
- utiliser l'ensemble du plan de travail pour travailler : les éléments à utiliser sont ramenés devant soi puis éloignés lorsqu'ils ne sont plus utilisés (préférer un geste de glissement ce qui évite de passer sur des bouchons, boîtes ou flacons, donc rompre le flux laminaire et donc contaminer)
- ne pas boucher les grilles d'aspiration et ne pas hésiter à changer de pipette si l'on a un geste contaminant (contact avec le plan de travail, l'extérieur d'un récipient,...)

2. Correction des calculs

2.1. Passage au 1/2, 1/5

On ne tient compte que de la suspension mère :

1/2 signifie que l'on inocule les nouvelles boîtes avec la moitié de la suspension initiale (on réalise alors deux nouvelles boîtes)

1/5 signifie que l'on inocule les nouvelles boîtes avec 1/5 de la suspension initiale (on réalise alors 5 nouvelles boîtes)

2.2. Nombre de boîtes réalisables

- 1^{ère} donnée : après arrêt de la trypsine, les cellules se retrouvent en suspension dans un volume de 6,5 mL (1,5 mL de trypsine + 5 mL de milieu complet)

→ on raisonne sur la boîte trypsinée, pas sur les boîtes à préparer.

- Comme la suspension contient 400 000 cellules par mL, dans la boîte on a :

$$6,5 \times 400\,000 = 2,6 \cdot 10^6 \text{ cellules}$$

- Comme les nouvelles boîtes sont inoculées par $1,0 \cdot 10^6$ cellules, on peut donc en réaliser 2.

Cryoconservation des cellules animales

Les cellules animales peuvent être conservées par congélation à -196°C (azote liquide) dans leur milieu de culture riche en sérum de veau fœtal (10 à 20%) en présence d'un cryoprotecteur (glycérol ou surtout DMSO). Cette étape fait partie de l'entretien courant d'une lignée cellulaire.

Milieux de congélation:

Milieu classique:

20% S VF,
10% DMSO,
70% DMEM (ou RPMI)

Variante pour cellules fragiles:

90% SVF
10% DMSO (diméthyl sulfoxyde)

Condition à respecter

- Travailler sur une culture de cellules sub-confluente. Éviter les pipetages vigoureux et les centrifugations à haute vitesse avant la congélation.
- Réaliser une congélation progressive.
- Réaliser une décongélation rapide (cytotoxicité accrue du cryoconservateur lors d'une décongélation douce).

Protocole de congélation

- Préparer le milieu de congélation sans DMSO et le laisser dans la glace.
- Trypsiner si cellules adhérentes et arrêter l'action de la trypsine par addition de milieu + 10% SVF?
si cellules en suspension réaliser l'étape suivante.
- Compter les cellules en hématimètre de Malassez.
- Centrifuger 5 min à 400 g à 4°C .
- Éliminer le surnageant et placer le culot cellulaire dans la glace.
- Ajouter extemporanément au milieu de congélation le DMSO.
- Dans la glace, resuspendre le culot cellulaire dans un volume de milieu de congélation pour obtenir $5 \cdot 10^6$ cellules.mL⁻¹
- Aliquoter par 1mL dans des cryotubes Nunc (spéciaux congélation dans N₂ liquide) ou des Eppendorfs marqués avec stylo dont l'encre résiste et entourés de scotch.
- 2 cas: i/ enrober de mousse et placer à -80°C (congélation lente),
ii/ laisser 2h à 4°C , puis 8h à -20°C , puis à -80°C (congélation par palier).
- Consigner sur un cahier: le type de cellules, la date de congélation, les conditions de congélation, la place dans le congélateur.

Protocole de décongélation

- Préparer la boîte de culture avec 10mL de milieu de culture approprié +20% de SVF final.
- Faire décongeler rapidement le tube de congélation au bain mairie à 37°C
- Désinfecter l'extérieur du tube avec un jet d'alcool à 70° .
- Transférer le 1mL de suspension cellulaire décongelée dans le milieu de culture.
- Prélever un aliquote et numérer les cellules viables. Déterminer le rendement de conservation.
- Placer dans l'incubateur à 37°C , 5% CO₂.
- Après 24h, changer le milieu et placer les cellules en milieu +10% SVF.

For improved performance
dye concentrations were changed

CERTIFICATE OF ANALYSIS

**GeneRuler™
1kb DNA Ladder**

#SM0311 250(5x50)µg

Lot:

Concentration: 0.5µg/µl
Supplied with: 2x1ml 6X Loading Dye Solution

Store at -20°C.

2

In total 7 vials.

ISO 150
www.fermentas.com

Description

GeneRuler™ 1kb DNA Ladder is prepared from six different plasmids, containing pUC, λ, phage and yeast genome sequences, which were individually digested with appropriate restriction endonucleases. The DNA Ladder is dissolved in storage buffer. The DNA Ladder contains the following 14 discrete fragments (in base pairs): 10000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3500, **3000**, 2500, **2000**, 1500, 1000, 750, 500, 250.

Storage Buffer

10mM Tris-HCl (pH7.6), 1mM EDTA.

6X Loading Dye Solution

10mM Tris-HCl (pH 7.6), 0.03% bromophenol blue, 0.03% xylene cyanol FF, 60% glycerol and 60mM EDTA.

Quality Control Assay Data

Analysis of 0.5µg (1µl) of the DNA Ladder on agarose gel by ethidium bromide staining generates 14 discrete bands pattern.

Quality authorized by:

 Jurgita Zilinskiene

RECOMMENDATIONS FOR USE

- Prepare the DNA Ladder before loading:
1µl (0.5µg) of the DNA Ladder;
1µl of 6X Loading Dye Solution;
4µl of deionized water;
- vortex gently just prior to use;
- do not heat before loading;
- apply the prepared amount (6µl) of the DNA Ladder on a 5mm lane of agarose gel;
- following electrophoretic separation on gel, visualize the DNA bands by ethidium bromide staining.

Note

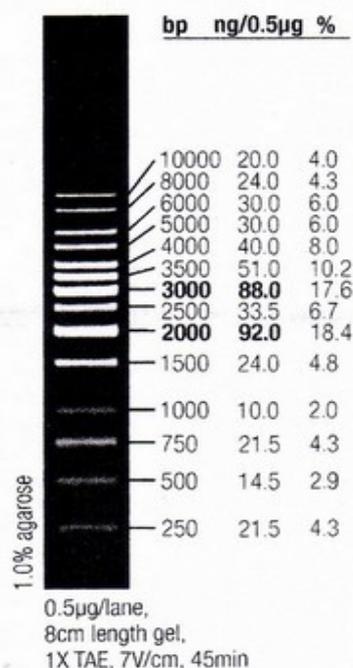
- One vial (50µg) is sufficient for ~100 applications.
- Use 0.1µg (0.2µl) of the DNA Ladder (before dilution) per 1mm of an agarose gel lane width.

PRODUCT USE LIMITATION.

This product is developed, designed and sold exclusively for research purposes and *in vitro* use only. The product was not tested for use in diagnostics or for drug development, nor is it suitable for administration to humans or animals.

Please refer to www.fermentas.com for Material Safety Data Sheet of the product.

GeneRuler™ 1kb DNA Ladder



Revised 28.05.2004