



Roth est toujours de bon conseil.

Information technique

Utilisation de la trypsine dans le passage / la subculture des cellules.

Les cellules en culture doivent être passées (divisées, sous-cultivées) régulièrement. Dans le cas de cellules adhérentes, elles sont détachées des surfaces de culture et partiellement transférées dans de nouveaux flacons de culture contenant un milieu de culture frais. Cela permet d'éviter que les cellules ne soient exposées à des contacts cellule-cellule trop étroits et que leur taux de division cellulaire ne diminue en raison de l'inhibition des contacts cellulaires qui en résulte. La fréquence à laquelle les cellules doivent être transférées dépend du type de cellule. Habituellement, les cellules sont transférées dans de nouveaux flacons de culture dans des conditions de culture standard (37°C, 5% CO₂) à environ 80% de confluence (couverture de surface). La dissociation ou le détachement des cellules des surfaces de culture à l'aide de trypsine ou de solutions de trypsine/EDTA est de loin la méthode la plus courante dans la culture cellulaire de routine.

La trypsine est une enzyme digestive appartenant aux protéases à sérine, d'un poids moléculaire de 23,3 kDa, qui provient du pancréas des porcs. Elle développe sa plus grande activité à un pH optimal de 7,5-8,5 et à une température de 37 °C. *In vivo*, la trypsine est produite dans le pancréas sous la forme du zymogène inactif trypsinogène. Après avoir atteint le duodénum, l'activation du trypsinogène en trypsine est catalysée par l'entéropeptidase. Une fois que de petites quantités de trypsine sont présentes, il y a une auto-activation accrue du trypsinogène par la trypsine, ce qui accélère à son tour la formation de la trypsine. La tâche fonctionnelle de la trypsine est le clivage hydrolytique des protéines et des peptides. Dans ce processus, la trypsine clive le côté C-terminal des résidus de lysine et d'arginine. L'exception ici sont les séquences Lys-Pro et Arg-Pro, qui ne sont pas coupées. De même, la trypsine n'attaque que lentement les liaisons peptidiques entre un acide aminé basique (Lys, Arg) et un acide aminé acide (Glu, Asp).

La trypsinisation conduit ainsi au clivage des protéines d'adhésion par lesquelles les cellules adhèrent à la surface des flacons de culture. Cependant, la trypsine a également des effets secondaires indésirables, c'est pourquoi il est important d'arrêter la trypsinisation après un certain temps. À cette fin, une étape d'inhibition ou de neutralisation est nécessaire. L'inhibition de la trypsine est obtenue soit par FCS/FBS, si des milieux contenant du sérum sont utilisés, soit par des inhibiteurs de trypsine.

La trypsine est souvent utilisée dans la culture cellulaire de routine en combinaison avec l'**EDTA**. L'EDTA est un agent chélateur et renforce la capacité de la trypsine à détacher les cellules adhérentes. L'EDTA fixe le calcium et le magnésium, ce qui affaiblit d'autant les contacts entre les cellules. Cela favorise l'hydrolyse de liaisons peptidiques spécifiques par la trypsine.

Réactifs recommandés par Carl Roth

ROTI@Cell Milieux	
ROTI@Cell Trypsin Solution (1x)	Référence 1Y17
ROTI@Cell Trypsin Solution (10x)	Référence 1Y16
ROTI@Cell Trypsin/EDTA Solution (1x)	Référence 1Y1A
ROTI@Cell Trypsin/EDTA Solution (10x)	Référence 1Y19
Inhibiteur de trypsine	Référence 2949
ROTI@Cell DPBS (sans Ca/Mg)	Référence 9124
ROTI@Cell PBS	Référence 9143
ROTI@Cell Eau	Référence 9186



Roth est toujours de bon conseil.

Information technique

Protocole commun pour le passage des cellules :

La trypsinisation doit être effectuée sous un flux laminaire dans des conditions stériles.

Selon le type de cellule, il peut y avoir des variations dans les temps d'incubation et les concentrations de trypsine. Les solutions 10x doivent être préalablement diluées à une solution 1x.

1. Décongeler la solution Trypsin ou Trypsin/EDTA dans un bain-marie à +37°C ou pendant la nuit entre +2°C et +8°C. Homogénéiser en remuant doucement.
2. Laisser le PBS / DPBS sans Ca²⁺ et Mg²⁺ et le milieu de culture cellulaire approprié (voir les réactifs recommandés) se réchauffer à température ambiante s'il a été précédemment stocké à +4°C.
3. Au microscope optique, vérifiez que les cellules ont atteint la confluence souhaitée et sont dans un état vital sans contamination.
4. Avec une pipette, éliminez soigneusement le milieu dans le flacon de culture cellulaire, en laissant la couche cellulaire aussi intacte que possible. **Astuce** : Inclinez la fiole de culture cellulaire et retirez le milieu d'un seul coin de la fiole.
5. Laver la couche cellulaire avec du PBS / DPBS sans Ca²⁺ et Mg²⁺ (environ 5 ml de solution saline par 25 cm²). **Conseil** : Laisser la solution saline s'écouler dans le flacon le long du côté sans cellules du flacon de culture cellulaire. Agiter légèrement le flacon de culture cellulaire afin que la solution saline lave doucement la couche de cellules. Retirer ensuite avec précaution la solution saline (voir le conseil du point 4.).
6. Ajoutez de la trypsine ou une solution de trypsine/EDTA réchauffée dans le flacon de culture cellulaire de manière à recouvrir complètement la couche cellulaire (200 µl suffisent pour une couche cellulaire de 25 cm²).
7. Incuber la trypsine ou la solution de trypsine/EDTA sur la couche cellulaire pendant environ 3 minutes à 37°C dans l'incubateur. Pour un traitement plus doux, incuber à température ambiante avec un temps d'incubation prolongé. Dès que les cellules apparaissent arrondies et flottent au fond du flacon, la trypsinisation peut être arrêtée. Vérifier au microscope optique si toutes les cellules sont détachées. **Conseil** : en tapant doucement sur le flacon de culture cellulaire, les cellules se détachent beaucoup plus rapidement, de sorte que la trypsinisation peut être arrêtée plus tôt.
8. Inhiber la trypsine en prélevant directement les cellules dans un milieu de culture cellulaire frais contenant du sérum (environ 5 ml pour une couche de cellules de 25 cm²). A moins de travailler avec du sérum (FCS/FBS), l'inhibition de la trypsine est réalisée en utilisant une solution d'inhibiteur de trypsine (1 mg/ml dans de l'eau ou du PBS) dans un rapport de 1:1 avec la solution de trypsine et l'absorption ultérieure dans le milieu de culture cellulaire. **Conseil** : Rincer le milieu frais de la pipette avec un peu plus de pression directement sur le fond du flacon précédemment recouvert de cellules, afin que même les dernières cellules soient détachées du flacon. En réabsorbant la suspension cellulaire résultante, cette étape de rinçage peut être répétée (environ 3 fois) et ainsi le fond entier du flacon peut être "rincé". Au cours de cette étape, les éventuels amas de cellules sont également dissous.
9. Transférer la suspension cellulaire dans un falcon frais et centrifuger les cellules (5 min, 1000 rpm). **Conseil** : Pendant l'étape de centrifugation, prévoir de nouveaux flacons de culture cellulaire ou même des plaques à puits, les étiqueter et fournir du milieu si nécessaire.
10. Après centrifugation, éliminer l'excès et remettre en suspension le culot cellulaire dans un milieu de culture cellulaire frais. Utiliser la quantité appropriée de milieu pour obtenir la densité cellulaire souhaitée. **Conseil** : Pour les expériences sur les cellules, le nombre de cellules est déterminé à ce stade à l'aide d'une chambre de comptage Neubauer (ajouter 10 µl de suspension cellulaire à la chambre de comptage).



Roth est toujours de bon conseil.

Information technique

11. La suspension cellulaire peut ensuite être transférée dans de nouveaux flacons de culture cellulaire ou des plaques à puits. Pour obtenir la densité cellulaire appropriée, un milieu peut être fourni à cet effet (voir le conseil à l'étape 9). En déplaçant légèrement le flacon de culture cellulaire vers le nord, le sud, l'est et l'ouest sur la table à flux laminaire, les cellules sont réparties uniformément. Attention : La suspension cellulaire ne doit pas pénétrer dans le goulot du flacon.

Remarque : le temps entre les différentes étapes doit être aussi court que possible afin que les cellules ne restent pas sèches trop longtemps.

L.H,16.11.22