

**Trypsin – EDTA 10X**  
w/o Calcium w/o Magnesium w/o Phenol Red

**REF N :** X0930

**pH théorique :**  $7.0 \pm 0.3$

**Osmolarité :**  $450 \pm 10\%$  mOsm/l

**Couleur :** solution incolore

**Conditions de stockage :**  $-20^{\circ}\text{C}$

La répétition des cycles de congélation / décongélation réduit l'activité enzymatique et doit donc être évitée

**Durée de vie :** 24 mois

**Tests de Stérilité :**

- Bactéries dans des conditions aérobies et anaérobies
- Levures et champignons

**Test d'activité :** L'activité de la trypsine est testée sur des cellules L929

**Composition :** Diffusé sur le site internet, également disponible sur demande

**Recommandation d'utilisation :**

Manipuler ce milieu dans des conditions aseptiques.

Le produit est destiné à un usage in vitro en laboratoire uniquement, ne pas en faire un usage thérapeutique, humain ou vétérinaire.

**Description :**

La trypsine est une enzyme pancréatique issue de porcs communément utilisée pour la dissociation et la désagrégation des tissus et cellules de mammifères adhérentes. La concentration de trypsine nécessaire pour détacher les cellules de leur support dépend de la sensibilité des cellules, et de l'activité de la trypsine.

**Utilisation :**

L'exposition des cellules à la trypsine doit être aussi brève que possible, en effet la trypsine est nocive pour les membranes protéiques des cellules sensibles et elle peut être absorbée par la cellule par pinocytose. La présence de sérum réduit ces effets en effet, il contient des protéines qui inhibent l'activité enzymatiques et des facteurs permettant la réparation des dommages cellulaires.

Dans des conditions de milieux sans sérum, un inhibiteur de trypsine et des températures basses sont recommandées pour diminuer ces effets indésirables.

**Instructions de dilutions pour une solution 10X :**

1. La trypsine peut être décongelée à l'aide d'un bain-marie à 37°C ou laissée une nuit entre 2 et 8°C.
2. Transférer aseptiquement 100ml de trypsine 10X dans un flacon stérile de 1 litre
3. Ajouter 800ml d'une solution saline sans calcium ni magnésium. Les solutions disponibles sont les suivantes :
  - Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS) , n° catalogue:L0615
  - Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) , n° catalogue:L0611
4. Bien agiter pendant quelques minutes
5. Mesurer le pH sur un petit échantillon. Si nécessaire, ajuster le pH entre 7.2 et 7.8 avec HCl 1N ou NaOH 1N
6. Ajuster le volume final à 1litre avec la solution saline stérile et aliquoter la préparation

**Méthode d'utilisation :**

1. La trypsine peut être décongelée à l'aide d'un bain-marie à 37°C ou laissée une nuit entre 2 et 8°C.
2. Aspirer et rejeter le milieu de culture utilisé pour la culture cellulaire.
3. Rincer les cellules avec une petite quantité de solution de trypsine ou une solution sans calcium ni magnésium (solutions ci-dessous), aspirer la solution de rinçage et la jeter.
  - Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS) catalogue N° L0615
  - Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) catalogue N° L0611
4. Ajouter la solution de trypsine préchauffée à 37°C avec un bain-marie pour couvrir complètement les cellules.
5. Incuber le flacon de culture à 37°C, ou à 4°C pour les cellules les plus sensibles (le temps d'incubation requis pour détacher les cellules de leur support est dépendant du type cellulaire, de la densité cellulaire, de la concentration en sérum présent dans le milieu de culture, de l'activité de la trypsine et du délai depuis le dernier repiquage. La trypsine provoque des dommages sur les cultures cellulaires et le temps d'exposition doit être maintenu au minimum).
6. Lorsque la trypsinisation est suffisante, les cellules vont apparaître rondes lors de l'observation sous microscope et la solution dans le flacon apparaîtra trouble. Contrôler souvent le flacon pour éviter une surexposition qui endommagerait les cellules.
7. La trypsine doit être neutralisée par un milieu contenant du sérum ou un inhibiteur de trypsine. Centrifuger doucement la suspension cellulaire et jeter le surnageant contenant la trypsine.
8. Re-suspendre le culot cellulaire avec du milieu frais et effectuer vos comptages ou la culture désirée.

**Signes de détérioration :**

La solution doit être claire et sans particules ou flocons.

Ne pas utiliser la solution si elle n'est pas limpide ou si elle contient des précipités.

D'autres preuves de détérioration peuvent être un changement de couleur ou une dégradation des caractéristiques physiques ou des performances de la solution.