

Jan 20, 2025

Version 1

Subcultivo o Pase de Cultivos Celulares V.1

DOI

<https://dx.doi.org/10.17504/protocols.io.5jyl8dk5rg2w/v1>

Judit Garcia¹

¹Universidad Católica San Antonio de Murcia (UCAM)

UCAM HITECH



Judit Garcia

Universidad Católica San Antonio (UCAM)

Create & collaborate more with a free account

Edit and publish protocols, collaborate in communities, share insights through comments, and track progress with run records.

Create free account

OPEN  ACCESS



DOI: <https://dx.doi.org/10.17504/protocols.io.5jyl8dk5rg2w/v1>

Protocol Citation: Judit Garcia 2025. Subcultivo o Pase de Cultivos Celulares. **protocols.io**

<https://dx.doi.org/10.17504/protocols.io.5jyl8dk5rg2w/v1>

License: This is an open access protocol distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](#), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited



Protocol status: Working

We use this protocol and it's working

Created: January 20, 2025

Last Modified: January 20, 2025

Protocol Integer ID: 118728

Keywords: transferir células de un recipiente de cultivo, cultivos celulares, otro nuevo para mantenerla, este proceso, crecimiento

Abstract

Consiste en transferir células de un recipiente de cultivo a otro nuevo para mantenerlas en condiciones óptimas de crecimiento. Este proceso se realiza cuando las células alcanzan una confluencia entre el 70% u 80%.

Guidelines

Gestión de residuos:

	A	B	C	D
	Tipo de residuo	Envase	Etiqueta	Ejemplos
	Sólidos no punzantes (L.E.R. 180103)	Contenedor negro con etiqueta de residuo biológico (situado al lado de la campana).	Pictograma peligro biológico.	Frascos de cultivo. Pipetas serológicas y puntas. Pipetas de vidrio. Tubos. Cualquier material que haya entrado en contacto con restos no inactivados. Recipientes de los reactivos.
	Sólidos punzantes (L.E.R. 180103)	Contenedor amarillo.	Etiqueta en el envase.	Pipetas de vidrio.
	Líquidos → residuos sanitarios (L.E.R. 180103)	Podrán verterse al desagüe habiendo añadido previamente un 10% de lejía durante al menos 20 minutos.	Sin etiqueta.	Restos del aspirador en el matraz.

Pictogramas de seguridad



Materials

Materiales y equipamientos:

- Cabina de bioseguridad II
- Baño termostático
- Rollo de papel
- Frasco con células en cultivo adherente
- Aspirador con salida en un matraz erlenmeyer con lejía
- Puntas de vidrio para el aspirador
- Pipetas graduadas
- Auxiliar de pipeteo
- Tubos falcon de 15 mL
- Centrífuga
- Frascos de cultivo nuevos
- Micropipeta
- Puntas de micropipeta
- Eppendorfs
- Cámara de Neubauer y cubreobjetos (conteo manual)
- Portaobjetos con pocillos para conteo (conteo con el contador automático)

Reactivos:

- Etanol al 70% (preferiblemente en una botella tipo spray)
- PBS a 37°C (dejar en el baño termostático al menos 10 minutos)
- DMEM a 37°C (dejar en el baño termostático al menos 10 minutos)
- Tripsina (mejor no calentarla pierde efectividad)
- Azul de tripán

Before start

EPIs y equipos de seguridad

- Bata (con puño preferiblemente)
- Guantes
- Manguitos
- Mascarilla (recomendable)
- Gafas de seguridad (recomendable)
- Cabina de seguridad biológica tipo II

- 1 Encender la cabina y poner la luz UV durante al menos 10 minutos.
- 2 Apagar la luz UV y desinfectar la cabina con etanol al 70%.
- 3 Introducir todo el material necesario en la cabina, desinfectándolo con etanol al 70%.
- 4 Retirar el medio del frasco mediante aspiración.
- 5 Pipetear 8 mL (frasco de 75) o 5 mL (frasco de 25) de PBS al frasco y posteriormente aspirar (para lavar el frasco).
- 6 Añadir 2 mL (frasco de 75) o 1 mL (frasco de 25) de tripsina y dejar reposar de 3 a 5 minutos en el incubador.
- 7 Observar el frasco en el microscopio invertido para comprobar si las células se han despegado, si están adheridas se darán unos golpes al frasco por ambos laterales con la mano hasta que se despeguen, si ese método tampoco funciona habrá que dejar el frasco 1 minuto más en el incubador. Se repetirá este paso hasta que observemos las células en suspensión.
- 8 Se añadirán 6 mL de medio con suero fetal bovino (o el suero que se tenga) por cada mililitro de tripsina que se haya añadido al frasco (12 mL en un frasco de 75 // 6 mL en un frasco de 25). Mezclar bien y transferirlo a un tubo Falcon de 15mL.
- 9 Centrifugar a 200 G, 20°C, durante 5 minutos (protocolo 1 en la centrifuga de cultivos celulares).
- 9.1 RECUERDA: la centrifuga tiene que estar equilibrada para ello hay que enfrenar los tubos con el mismo peso.
- 10 Tras la centrifugación se forma un pellet con las células. Llevar el tubo a la cabina y retirar todo el sobrenadante mediante aspiración (mucho cuidado de no aspirar las células).
- 11 Resuspender las células con 1 mL de medio completo (el volumen dependerá del pellet obtenido, + pellet + medio, - pellet - medio).



- 12 Preparar un tubo eppendorf con 10 μ L de azul de tripán y 10 μ L de la suspensión anterior, mezclar. Aspirar 10 μ L de la mezcla del tubo eppendorf y transferirlo a una cámara de Neubauer (o el recipiente contador correspondiente)
- 13 Una vez conocida la concentración de células viables realizar cálculos para cultivar el número deseado de células en el nuevo frasco de cultivo.
- 14 Preparar el frasco nuevo rotulando lo siguiente: línea celular, n° de pase, fecha, cantidad de células cultivadas; además rellenar el frasco con la cantidad de medio que se requiera.
- 15 Cuando tenemos el frasco rotulado y con medio en su interior, es el momento de transferir la cantidad de volumen calculada anteriormente para cultivar las células deseadas.
- 16 Una vez finalizado el proceso, guardamos los frascos de cultivo en el incubador. Limpiamos y recogemos toda la zona de trabajo y los materiales empleados, además desechamos los residuos en su contenedor correspondiente.
- 17 Al finalizar el trabajo la campana debe limpiarse con etanol al 70% y encender la luz UV al menos 10 minutos.