

PROTOCOLO PARA EL CULTIVO PRIMARIO DE NEURONAS DE CEREBELO

CONDICIONES DE DISOCIACION: PURE100 COLLAGENASE 100U/ml

Protocolo para preparación de la solución de disgregación

1. Stock 1- Resuspender PURE100 Collagenase H/G 1500 CDU en 1.5 ml de agua MilliQ estéril (incluida en el pack). Almacenar a 4°C durante dos semanas o a -20°C si no va a ser utilizada en este tiempo.
2. Solución de disgregación: Para cada cultivo, tomar 4.5 ml de EBSS y añadir 500µl de solución Stock 1. Conservar a 4°C hasta su utilización.

Protocolo para la disgregación del tejido

1. Trocear mecánicamente el tejido en pequeños pedazos empleando el bisturí y transferir a un tubo estéril de 15 ml.
2. Añadir 5 ml de la solución de disgregación
3. Incubar a 37°C durante 60´
4. Centrifugar a 1000 rpm durante 10 min. Eliminar sobrenadante
5. Añadir 4 ml de MEDIO CONTROL y disociar 20-30 veces con pipeta pasteur hasta obtener una suspensión homogénea
6. Centrifugar a 1000 rpm durante 10 min. Eliminar el sobrenadante.
7. Resuspender en 5 ml de MEDIO CONTROL
8. Centrifugar 10 min a 300 rpm. Decantar el sobrenadante.
9. Resuspender las células en 500µl de MEDIO DE CULTIVO
10. Plaquear a una densidad de 4000 células/cm²
11. Incubar a 37°C en CO₂ 5%

MEDIOS Y SOLUCIONES

MEDIO CONTROL (500 ml)		
DMEM/F12 1X	415 ml	4°C-CU
30% GLUCOSA	10 ml	4°C-CU
7.5% NaHCO ₃	7.5 ml	4°C-CU
1 M HEPES	2.5 ml	4°C-CU
L-GLUTAMINA	5 ml	-20°C
HORMONE MIX(10X)	50 ml	-20°C
A/A (Antibiótico/Antimicótico)	10 ml	-20°C