Passage de C-Myoblast d’Alessandra :

Regarder si les cellules sont bien nombreuses

Enlever le milieu de la boîte (diamètre 15 ou 10 cm)

**Protocole pour boîte de 15 cm de diamètre**

Rincer 1 fois avec 10 mL de PBS, bien mélanger

Jeter le PBS, mettre la boîte à la verticale afin de récupérer l’excédent de PBS

Ajouter de la Trypsine (environ 2.5 mL), incuber pendant 1 min. (Attention de ne pas laisser plus d’1 min la Trypsine)

Regarder si les cellules se sont bien décollées, afin d’annuler les effets de la Trypsine, on complète avec au moins 10 mL de milieu de re-suspension (milieu de culture mais **sans Ultroser**). Bien « asperger » la boite. Agiter la boite horizontalement en forme de « croix » pour éviter que les cellules ne constituent des îlots.

Récupérer le milieu et l’y mettre dans un tube (~ 40 mL), on peut compléter avec du milieu de re-suspension selon si les cellules sont nombreuses.

Homogénéiser = « vortex » le tube

Prélever 10 µL du mélange pour le mettre sur la cellule de Malassez, compter. (Méthode Alessandra : compter toutes les cellules sur tous les carrés.)

(Nb de cellules comptées x 1000) x volume dans le tube (mL) = nb de cellules au total

On prélève la quantité de milieu voulue du tube précédent que l’on met dans un nouveau tube plus petit ( ~ 15-20 mL) **→** centrifuger pendant 7 min à 1700 rpm

Enlever le surnageant (en évitant de tout aspirer et donc les cellules avec ), compléter avec 1 mL de milieu complet (milieu de culture **avec Ultroser**), bien cisailler pour récupérer les cellules.

Dans une nouvelle boite de 15 cm de diamètre on y ajouter au préalable 18 mL de milieu complet.

Prélever les 1 mL du tube pour l’ajouter dans la boîte.