

ESPERIENZA #4:**Trasfezione di vettori di espressione in cellule in adesione con LIPOFECTAMINA.**

MATERIALE: Cellule, terreno completo, terreno Optimem, lipofectamina, reagente P3000, DNA, provette Eppendorf, micropipette e puntali.

- **CELLULE DA TRASFETTARE: U2OS** linea cellulare derivata da osteosarcoma umano (fibroblasti) crescita in adesione: le cellule sono seminate su 1 vetrino coprioggetto in capsula Petri da 35 mm.
- **DNA DA TRASFETTARE** (vedi mappe allegate):
Costrutti generati clonando diversi cDNA in fusione con il TAG HA nel vettore di espressione pCDNA3. Concentrazione 200 ng/μl.
- Lipofectamina e reagente P3000
- Soluzione Optimem;
- Provette Eppendorf, micropipette e puntali sterili.

PROCEDURA:

Per ogni trasfezione si preparano **2 provette**, una contenente il DNA (**D**) ed una contenente la lipofectamina (**L**). Le 2 soluzioni vanno poi mescolate per formare i complessi lipide-DNA, che vengono infine aggiunti alle cellule.

Sul banco: (per ogni trasfezione)

Calcolare i volumi (in microlitri) del DNA da trasfettare in base alle quantità richieste e alle concentrazioni fornite.

- Sotto cappa:** in una provetta Eppendorf (**L**) mettere 125 μl di **Optimem** e aggiungervi 2.5 μl di **Lipofectamina**, spipettando poi con la p200. Incubare per 5 minuti a TA.
- Sotto cappa:** nel frattempo, in un'altra provetta Eppendorf (**D**) mettere 125 μl di **Optimem** ed aggiungervi il volume di **DNA necessario per ottenere 1.6 μg** e 3.2 μl di reagente P3000 (rapporto 1μg DNA/2μl P3000).
- Sotto cappa:** allo scadere del tempo di incubazione (vedi a e b), **mescolare** il contenuto delle provette **L e D**. Incubare quindi per ulteriori 20 minuti a TA (può rimanere anche 30 minuti) per consentire la formazione dei complessi lipide-DNA.
- Svolto sul bancone:** durante l'ultima incubazione, aspirare il **terreno** dalle cellule da trasfettare, versarlo in un becher e sostituirlo con **1.25 ml di terreno completo**.
- Sul bancone:** allo scadere dell'incubazione, **aggiungere** la soluzione di **DNA-lipide** sulle cellule **goccia a goccia** (usando la p200) con un movimento a spirale, in modo da coprire tutta la superficie. Riporre nell'incubatore.

Il giorno seguente fissare le cellule e procedere con il saggio di immunofluorescenza.