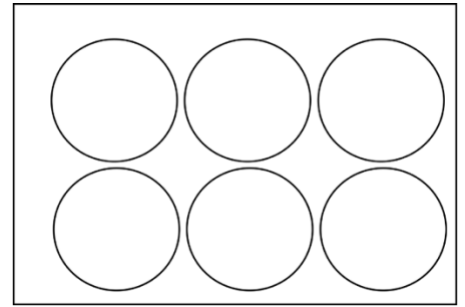


1) TRASFEZIONE TRANSIENTE PER SILENZIAMENTO GENICO

STRUMENTAZIONE:

- Pipette e puntali sterili (20, 200, 1000ul)
- Provette da 1,5 ml
- Vortex
- Microcentrifuga
- Cappa a flusso laminare
- Incubatore a 37 °C, 5% CO₂



MATERIALE:

- Piastra a 6 pozzetti con cellule U2OS
- Falcon da 50 ml con SOLUZIONE O
- Falcon da 50 ml con soluzione L
- Tubino da 1,5 ml con **siRNA C** (NUMERI PARI) – in ghiaccio
- Tubino da 1,5 ml con **siRNA S** (NUMERI DISPARI) – in ghiaccio

PROCEDIMENTO:

TEMPO STIMATO PER UNA REAZIONE 25'

OSSERVAZIONE CELLULE

- 1) Osservare le cellule al microscopio e verificare morfologia, adesione e confluenza (a seconda dell'ordine di lavoro sotto cappa questo step può essere svolto indipendentemente/post trasfezione)

LAVORARE SOTTO CAPP A FLUSSO LAMINARE (passare l'alcol sulle mani!)

- 1) Vi verrà assegnato un pozzetto di cellule da trasfettare contrassegnato da un numero (1 turno: 1-24) (2 turno 25-48) (3 turno 49 – 72)

Questo numero verrà mantenuto da ogni studente per le esercitazioni successive

PREPARAZIONE SOLUZIONE CONTENENTE i siRNA (mix B):

- 2) In un tubino da 1,5 ml inserire 120 µl di **soluzione O** (**siglare il tubino con il proprio numero**)
- 3) Prelevare 30 µl di **siRNA C** (numero pari) OPPURE **siRNA S** (numero dispari) e aggiungerli nella provetta contenente la **soluzione O**.
- 4) Vortex 5'' e spin 5''

PREPARAZIONE MIX di TRASFEZIONE:

- 5) prelevare 150 µl di **soluzione L** (**contenente il reagente di trasfezione**) dal tubo falcon da 50 ml e inserire nella provetta contenente 150 µl di **mix B** senza spipettare. Vortexare 5'' e spin 5''
- 6) Incubare la reazione 20 min a temperatura ambiente
- 7) Prelevare 300 µl della soluzione di trasfezione preparata al punto 5 e distribuire goccia a goccia sulle cellule di un pozzetto della piastra a 6 pozzetti (fare attenzione perché la soluzione è molto viscosa)
- 8) Muovere lentamente con movimenti circolari la piastra per mescolare bene
- 9) Rimettere le cellule in incubatore a 37°C. Le cellule verranno raccolte dai tutors a 72 ore di distanza per le analisi successive.