

## CAPÍTULO 9

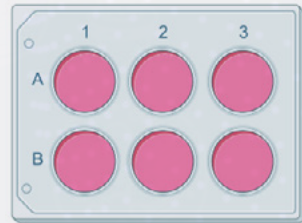
# TÉCNICA DE SILENCIAMIENTO GÉNICO

### 9.1. UTILIZANDO HIPERFECT

#### Día 1. Siembra celular y silenciamiento

Para realizar silenciamiento génico en placas de 6 pocillos (130184, *Biolite*) empleamos el reactivo *HiPerfect Transfection Reagent* (509301704, *Qiagen*) [2, 3, 6, 8, 11, 12].

1. Sembrar 2 pocillos por cada condición de tratamiento.
2. A razón de: 100 de *OPTI-MEM* (51985-026, *Gibco*)  
150.000 células en 2 ml/pocillo,  
siRNA de interés de 9-12 nM  
12  $\mu$ l de *HiPerfect*.

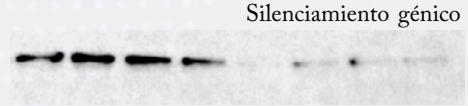


NOTA: Elaborar la misma mezcla con siRNA para el control negativo (*scrambled*) en paralelo.

3. Mezclar *OPTI-MEM* y siRNA.
4. Dejar reposar 5 min a T<sup>a</sup> ambiente.
5. Añadir *HiPerfect*. Dejamos reposar 15 min a T<sup>a</sup> ambiente.
6. En este tiempo de espera, tripsinizar las células y prepara el volumen que vamos a necesitar de células a la concentración de 150.000 células por pocillo en un medio sin antibiótico.
7. Una vez tenemos las dos mezclas por separado añadimos a las células, gota a gota la mezcla del complejo (*OPTI-MEM* + *HiPerfect* + siRNA).
8. Repartimos en placa tras homogeneizar suavemente.

## Día 2. Cambiar medio

9. A las 24 horas de incubación se cambia el medio en la placa y se añade medio normal con antibiótico.



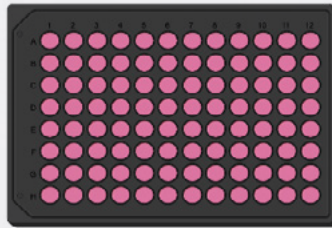
## Día 3. Tratamiento

10. Pasadas otras 24 horas se añade el tratamiento de interés y pasado el tiempo del tratamiento específico procedemos al lisado para realizar la técnica de *Western blotting*.

## 9.2. UTILIZANDO RNAiMAX

### Día 1. Siembra celular y silenciamiento

1. Para realizar silenciamiento génico en placas de 96 pocillos (353219, Corning) utilizamos el reactivo *Lipofectamine RNAiMAX Transfection* (13778150, Invitrogen) [8, 12].



2. Sembramos 5 pocillos por cada condición de tratamiento.  
A razón de: 20  $\mu$ l de *OPTI-MEM* (51985-026, Gibco)  
6.000 células por pocillo en un volumen de 100  $\mu$ l  
0,2  $\mu$ l de RNAimax  
siRNA de interés a 6 nM

NOTA: Elaborar la misma mezcla con siRNA para el control negativo (*scrambled*) en paralelo.

3. Mezclar *OPTI-MEM* y siRNA.
4. Dejar reposar 5 min a T<sup>a</sup> ambiente.
5. Añadir RNAimax.
6. Dejamos reposar 15 min a T<sup>a</sup> ambiente.
7. En este tiempo de espera, tripsinizar las células y prepara el volumen que vamos a necesitar de células a la concentración de 6.000 células/pocillo en un medio sin antibiótico.
8. Una vez tenemos las dos mezclas por separado añadimos a las células, gota a gota la mezcla del complejo (*OPTI-MEM* + RNAimax + siRNA).
9. Repartimos en placa tras homogeneizar suavemente.



### Día 2. Cambiar medio

10. A las 24 horas de incubación se cambia el medio en la placa y se añade medio normal con antibiótico.

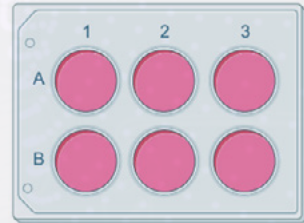
### Día 3. Tratamiento

11. Pasadas otras 24 horas se añade el tratamiento de interés y pasado el tiempo del tratamiento específico procedemos a fijar la placa con PFA como se detalla en el apartado de microscopía.

## 9.3. UTILIZANDO LIPOFECTAMINE 2000

### Día 1. Siembra celular

1. Para realizar silenciamiento génico en placas de 6 pocillos (130184, Biolite) utilizamos el reactivo *Lipofectamine 2000 Reagent* (11668-019, Invitrogen).
2. Sembramos 3 pocillos por cada condición de tratamiento y 1 pocillo de control positivo *KIFF11 (Eg5)* (AM4639, Ambion) a 30-50% de confluencia. Utilizamos medio sin antibiótico.



### Día 2. Silenciamiento

A razón de: 4  $\mu$ l de *Lipofectamine 2000* + 200  $\mu$ l de *OPTI-MEN* (51985-026, Gibco)  
siRNA de interés a 33 nM + 200  $\mu$ l de *OPTI-MEN* (51985-026, Gibco)

NOTA: Elaborar la misma mezcla con siRNA para el control positivo (KIFF11) en paralelo.

3. Mezclar *OPTI-MEN* y siRNA.
4. Mezclar *OPTI-MEN* y *Lipofectamine 2000*.
5. Dejar reposar 5 min a T<sup>a</sup> ambiente.
6. Mezclar *OPTI-MEN* y siRNA + *OPTI-MEN* y *Lipofectamine 2000*.
7. Dejar reposar 20 min a T<sup>a</sup> ambiente.
8. Eliminar de cada pocillo el volumen de medio que vamos a añadir de la mezcla del complejo (*OPTI-MEN* + *Lipofectamine 2000* + siRNA).
9. Añadir a cada pocillo el volumen de la mezcla del complejo (*OPTI-MEN* + *Lipofectamine 2000* + siRNA).
10. Homogeneizar suavemente.

### Día 3. Cambiar medio

11. A las 24 horas de incubación cambiar el medio a la placa y añadir medio normal con antibiótico.

### Día 4. Tratamiento

12. Pasadas otras 24 horas se añade el tratamiento de interés y pasado el tiempo del tratamiento específico procedemos a la recogida de células y posterior lisado.