

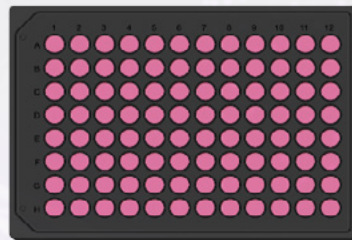
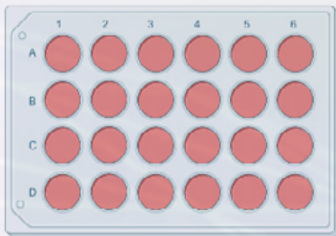
## CAPÍTULO 10

# TÉCNICA DE SOBREEXPRESIÓN GÉNICA

Para la introducción de proteínas exógenas marcadas (plásmidos bacterianos en ocasiones marcados) se realiza una transfección, que consiste en la introducción de ADN o ARN de un virus o bacteriófago procarionta en el interior celular. En este caso realizamos una transfección química.

### Día 1. Siembra celular

1. Sembrar células en placa de 96 pocillos (353219, Corning) y de 24 pocillos (3524, Corning) en medio completo sin antibiótico, con el fin de alcanzar una confluencia del 90%.



### Día 2. Transfección

2. Realizar la transfección química empleando el reactivo *Lipofectamine 2000 Transfection Reagent* (11668027, Invitrogen) [1, 2, 9, 12, 14].
3. Preparamos dos mezclas:

Mezcla A: *Lipofectamine 2000*<sup>®</sup> (X  $\mu$ l de *lipofectamine*, depende del plásmido y del modelo celular) + 100  $\mu$ l de medio *OPTIMEM*. Esperar 15 min.

Mezcla B: Plásmido (X  $\mu$ l de plásmido, depende del plásmido y modelo celular) + 100  $\mu$ l de medio *OPTIMEM*. Mezclar A + B. Esperar 15 min.

4. Añadir 200  $\mu\text{l}$  de la mezcla a cada pocillo (realizar cálculos de forma previa) que ha de ser previamente lavado con PBS 1X y sustituir el medio por 800  $\mu\text{l}$  de medio *OPTIMEM*. La transfección se realiza en 1 ml de volumen total. Esperar 5 h de transfección y se añade 1 ml de medio completo con el doble de suero.

### Día 3. Análisis

Observar las células al microscopio de fluorescencia y si la transfección presenta una buena eficiencia. Al día siguiente se realiza el tratamiento en medio completo, se fijan (placa de 24 o 96 pocillos) y se montan las lamelas (placa 24 pocillos) para su observación si se va a realizar la técnica de inmunofluorescencia o se lisan (placa 6 pocillos) si se va a realizar análisis de la sobreexpresión por *Western blotting*.

