

PROTOCOLO EXPERIMENTAL TRANSFECCIÓN CELULAR

MÉTODOS

➤ DÍA 1

a. Transfección de células eucariotas con un vector de fluorescencia verde (GFP) empleando Lipofectamina LTX (15338100 Invitrogen)

Las células (en pase bajo) deben encontrarse en un 70-90% de confluencia en el momento de la transfección.

1. Cambiar el medio de cultivo celular por medio fresco bajo en suero (2%) sin antibióticos 1-2 horas antes de la transfección (8 ml para una placa 55 cm²).

2. Usar la siguiente tabla para el experimento de transfección (superficie de cultivo-cantidad DNA plásmido-lipofectamina LTX):

Culture Vessel	Growth area / well	Multiplication factor ¹	Vol. plating growth medium	Vol. complex Opti-MEM per well	DNA (µg)	Plus (µL)	Lipid reagent ² (µL)
96-well	0.32 cm ²	0.17	100 µL	2 × 5 µL	0.1	0.1	0.2–0.5
48-well	0.95 cm ²	0.50	250 µL	2 × 12.5 µL	0.25	0.25	0.5–1.3
24-well	1.9 cm ²	1.00	500 µL	2 × 25 µL	0.5	0.5	1–2.5
12-well	3.8 cm ²	2.00	1 mL	2 × 50 µL	1	1	2–5
6-well	9.5 cm ²	5.00	2 mL	2 × 100 µL	2.5	2.5	5–12.5
60-mm	21 cm ²	11.05	5 mL	2 × 250 µL	5.5–11	5.5–11	11–28
10-cm	55 cm ²	28.95	10 mL	2 × 500 µL	14–28	14–28	29–73
T75	75 cm ²	39.47	15 mL	2 × 750 µL	20–40	20–40	39–100
T175	175 cm ²	92.11	35 mL	2 × 1.75 mL	46–90	46–90	92–230

3. Diluir 15 µg de vector DNA-GFP en 500 µl de **OPTI-MEM (11058021 Gibco)** (medio reducido en suero recomendado para transfecciones con reactivos lipídicos catiónicos) en un vial eppendorf esterilizado de 1.5 ml.

4. Diluir 30 µl de Lipofectamina LTX (**ratio 1:2 DNA µg-lipofectamina µl**) en 500 µl de OPTI-MEM en un vial eppendorf esterilizado de 1.5 ml.

5. Añadir 15 µl de Plus *reagent* en la mezcla de DNA diluido (**ratio 1:1 DNA µg-Plus *reagent* µl**) e incubar 5 minutos a temperatura ambiente.

6. Mezclar el DNA-GFP diluido con la Lipofectamina LTX diluida (V final≈ 1000 µl) e incubar 20-25 minutos a temperatura ambiente para la formación de complejos DNA-lípidos.

7. Dispensar la mezcla de transfección gota a gota en el frasco/placa de cultivo (55 cm²) celular distribuyéndola de manera homogénea mediante agitación muy suave.

8. Incubar las células 12-16 horas a 37°C y 5% de CO₂.

➤ **DÍA 2**

b. **Sustitución del medio de transfección por medio completo fresco** 10% suero fetal bovino (FBS) y 1% Penicilina-Estreptomicina (10 ml).

c. **Incubación de las células 1-2 días** a 37°C y 5% de CO₂.

➤ **DÍA 3-4**

d. **Visualización de las células en microscopio de fluorescencia** para confirmar la eficacia de la transfección y la expresión de la proteína de fluorescencia verde (GFP).

