

# Transfection transitoire de construction plasmidique pcDNA3 dans des cellules en culture in vitro

## **1. MATERIELS ET REACTIFS**

### 1.1. Vecteur d'expression eucaryote pcDNA3

Voir photocopié sur le vecteur d'expression utilisé.

### 1.2. Réactifs de transfection

- DEAE-Dextran à 1 mg/ml dans du TBS (tris buffered saline) stérilisé par filtration (filtres millipore 0,22µm)
- plasmide purifié par miniprep dont la concentration est de .....µg/µL.

### 1.3. Matériels

- Boîtes de culture
- Lamelles de 15 mm de diamètre
- Solution éthanol-éther
- Milieu de culture DMEM et SVF

## **2. PROTOCOLE**

### 2.1. Transfection dans les cellules cos (par binôme)

Jour 1 : le travail suivant est à faire pour 4 puits:

- prendre une lamelle et la tremper dans une solution éthanol-éther
- enlever le surplus de liquide
- faire flamber la lamelle
- déposer un peu de milieu au fond du puit (quelques µL)
- déposer la lamelle dans le puit
- tapoter pour enlever les bulles d'air
- préparer une suspension de cellules cos (lavage PBS, trypsination, ajout de milieu de culture) puis numérer en chambre de comptage en diluant au 1/2 en bleu trypan
- déposer entre 20 000 à 40 000 cellules dans le puit (déterminer le volume V de la suspension à prélever)
- ajouter du milieu DMEM-10% SVF qsp 1,5 mL
- incuber 24 à 48 heures à l'étuve 5% CO<sub>2</sub>, 37°C.

Jour 2 : pour les 4 puits :

- laver les cellules semi-confluentes 2x DMEM seul
- dans 4 tubes eppendorf stériles, placer :

Tubes	Plasmide (en µg) dans 300µL de DMEM seul	DEAE-Dextran (1mg/mL) dans TBS
1	DMEM sans plasmide	300µL
2	B1: 1 à 1,5µg	300µL
3	B2: 1 à 1,5µg	300µL
4	B1 + B2 chacun + 1µg	300µL

- vortexer
- ajouter ces 600µL délicatement aux cellules
- laisser à 37°C entre 30min et 45min maximum et ajouter 0,9mL de DMEM-10% SVF
- laisser 3h à 37°C
- laver 2 fois avec environ 1,5mL de DMEM seul
- nourrir avec 1,5mL de DMEM-10% SVF et laisser 1 à 5 jours avant d'observer

## 2.2. Observations J3

- vider le milieu
- rincer les cellules avec 2mL de PBS
- fixer les cellules en ajoutant 300µL de paraformaldéhyde 4%, laisser incuber quelques min à 37°C
- laver rapidement en PBS
- récupérer la lamelle et sécher le plus possible la monocouche cellulaire sans toucher les cellules
- mettre une goutte de glycérol sur une lame propre et fixer la lamelle sur la lame
- observer en microscopie à fluorescence

## **3. COMPTE RENDU**

3.1. Réaliser un organigramme de la manipulation de transfection réalisée, préciser les calculs, les dénombrements...

3.2. Analyse des transfections par les différents plasmides

a) évaluer la proportion de cellules transfectées dans la population observée. En déduire l'efficacité de transformation

b) schématisez une cellule transfectée et une cellule non transfectée. Conclure à la localisation subcellulaire de la coloration et donc des sous unité B1 et B2 du récepteur GABA, ainsi que du récepteur complet BIB2.