

## 54. Transfecção de DNA por eletroporação

1. Coletar células a serem transfectadas de cultivos na fase intermediária a tardia de crescimento. Utilizar tripsina para liberação das células aderentes. Centrifugar a 1.500 rpm por 5 minutos a 4°C.
2. Ressuspender o *pellet* em 0,5X o volume original do meio de crescimento e realizar a contagem do número de células.
3. Coletar as células por centrifugação a 1.500 rpm por 5 minutos a 4°C e ressuspender em meio de cultivo (MEM) a uma concentração final de  $2.5 \times 10^6$  a  $2.5 \times 10^7$  células/mL.
4. Transferir alíquotas de 400µl da suspensão de células ( $10^6$  a  $10^7$  células) para as cuvetas de eletroporação. Colocar as cuvetas no gelo.
5. Ajustar os parâmetros no aparelho de eletroporação. O valor típico de capacitância utilizado 1050 µF. As voltagens variam de 200 a 350 V, dependendo da linhagem celular, mas geralmente utiliza-se uma voltagem média de 260 V. Usar um valor infinito de resistência interna. Descarte uma cuveta contendo apenas PBS pelo menos duas vezes antes de iniciar a eletroporação das células.
6. Adicione 10-30µg de DNA plasmidial em um volume de 40µl a cada cuveta contendo as células. Misture gentilmente as células por pipetamento.  
OBS.: Não produzir bolhas de ar na suspensão durante o passo de mistura.
7. Imediatamente transfira a cuveta ao eletroporador e descarregue o dispositivo. Após 1-2 minutos remova a cuveta, transferindo-a para o gelo e proceda imediatamente o próximo passo.
8. Transfira as células eletroporadas a placas de cultivo de 6 cavidades. Lavar as cuvetas com MEM, transferindo o meio de lavagem para a placa de cultivo. Transferir a placa para a estufa a 37°C suplementada com 5% de CO<sub>2</sub>.
9. Repetir os passos 6-8 até todas as amostras de DNA serem transfectadas. Anotar o tempo de pulso para cada cuveta para facilitar comparações entre experimentos.