

Transfektion von siRNA in murine Keratinozyten in Suspension („reverse“ transfection) (Hatzfeld lab, Halle)

Zelldichte: 0,6 – 0,7 x 10⁵ Zellen je cm²

Menge siRNA für 24well: 25 pmol siRNA in 50µl serumfreies KERATINOZYTEN-Medium

Menge Lipofectamine2000: 1,5µl in 50µl serumfreies Keratinozyten-Medium

Übersicht Volumina

	Fläche	Transfektionsansatz zu Zellen	Kulturmedium
24 well	2 qcm	100 µl	400µl
12 well	4 qcm	200 µl	800µl
6 well	10 qcm	500 µl	2ml
6cm	20 qcm	1 ml	4ml
10cm	60 qcm	3 ml	12ml

Durchführung:

KERATINOZYTEN mit Trypsin zum Ablösen in den Brutschrank stellen
inzwischen Transfektionsansatz mit Lipofektamine2000 ansetzen:

benötigte Menge LF2000 in serumfreies KERATINOZYTEN-Medium geben (5min bei RT)

benötigte Menge siRNA in serumfreies KERATINOZYTEN-Medium geben
LF2000-Ansatz zu siRNA-Ansatz (20min bei RT; max. 30min)

KERATINOZYTEN von Schale ablösen

je 10cm-Schale in 5min KERATINOZYTEN-Vollmedium 3min bei 1500rpm

Zellzahlbestimmung

benötigte Menge KERATINOZYTEN ausplattieren (Zelldichte siehe oben)

Transfektionsansatz zu frisch ausplattierten KERATINOZYTEN geben

24h nach Transfektion Mediumwechsel, 48h nach Transfektion Ca²⁺-Zugabe

KD-Effizienz zwischen 48h und 72h nach Transfektion am höchsten