



provincia de buenos aires
comisión de
investigaciones científicas
Calle 526 e/ 10 y 11 1900 La Plata
Tel. Fax: (0221) 421 7374 / 6205 int.143
D.E.: perapoyo@cic.gba.gov.ar

PERSONAL DE APOYO A LA
INVESTIGACION Y DESARROLLO

INFORME PERIODO. 2011/2012.

1. APELLIDO Rodríguez

Nombre(s) Silvia Susana

Título(s) Bioquímica

Dirección Electrónica silsrodriguez@yahoo.com.ar

2. OTROS DATOS

INGRESO: Categoría. Asistente Mes Mayo Año 2012

ACTUAL: Categoría. . Asistente Mes Agosto Año 2012

3. PROYECTOS DE INVESTIGACION EN LOS CUALES COLABORA

a) Optimización de protocolos de biología molecular para el estudio de la regulación de canales de calcio activados por voltaje a través de receptores acoplados a proteína G.

b) Estudio de la farmacología y la regulación de subtipos de canales de calcio tipo L neuronales (CaV1.2 y CaV1.3) PICT 2010-1589

c) Rol de los canales de calcio operados por voltaje neuronales en la acción de Ghrelina sobre la producción y liberación de NPY. PICT 2011-1816.

4. DIRECTOR

Apellido y Nombre (s) Raingo Jesica

Cargo Institución Investigador Adjunto- CONICET

Dirección: Calle 526 y Camino General Belgrano (entre 10 y 11) Ciudad La Plata

C. P B1900BTE Prov. Buenos Aires Tel. (0221) 421-0112

Dirección Electrónica jraingo@imbice.org.ar

5. LUGAR DE TRABAJO

Institución .Instituto.Multidisciplinario.de.Biología.Celular. (IMBICE)

Dependencia CIC - CONICET

Dirección: Calle 526 y Camino General Belgrano (entre 10 y 11) Ciudad La Plata

C. P B1900BTE Prov. Buenos Aires Tel. (0221) 421-0112

6. INSTITUCION DONDE DESARROLLA TAREAS DOCENTES U OTRAS

Nombre Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de La Plata.

Dependencia Cátedra de Genética

Dirección: Calle 60 y 120

Ciudad La Plata C. P 1900 Prov. Buenos Aires Tel. (0221)

Cargo que ocupa....Ayudante diplomado rentado con dedicación simple.....

INDICE

INDICE.....	- 1 -
7. EXPOSICION SINTETICA DE LA LABOR DESARROLLADA EN EL PERIODO	- 2 -
7.1. - ACTIVIDAD DESARROLLADA	- 2 -
7.2. TÉCNICAS EMPLEADAS.....	- 2 -
7.2.1 CULTIVOS CELULARES.....	- 2 -
7.2.2 . TRANSFORMACIÓN DE BACTERIAS COMPETENTES.....	- 2 -
7.2.3 EXTRACCIÓN DE ADN PLASMÍDICO.....	- 2 -
7.2.4 DIGESTIÓN DE ADN PLASMÍDICO CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN (ER).....	- 3 -
7.2.5 ELECTROFORESIS SUMERGIDA EN GELES DE AGAROSA.....	- 3 -
7.2.6 TRANSFECCIÓN DE CÉLULAS CON ADN PLASMÍDICO.....	- 3 -
7.2.7 FIJACIÓN DE CÉLULAS.....	- 4 -
7.2.8 MICROSCOPIA Y CAPTURA DIGITAL.....	- 4 -
7.2.9 PATCH CLAMP	- 4 -
8. OTRAS ACTIVIDADES	- 4 -
9. TAREAS DOCENTES DESARROLLADAS EN EL PERIODO	- 4 -
10. OTROS ELEMENTOS DE JUICIO NO CONTEMPLADOS EN LOS TITULOS ANTERIORES.	- 5 -
ANEXO SOLUCIONES	6
ANEXO IMÁGENES	7
ANEXO PLÁSMIDOS AMPLIFICADOS.....	8

7. EXPOSICION SINTETICA DE LA LABOR DESARROLLADA EN EL PERIODO

7.1. - ACTIVIDAD DESARROLLADA

En el breve periodo que corresponde a este informe (3 meses) he llevado a cabo en el Laboratorio de Electrofisiología del IMBICE, con la dirección de la Dra. Jesica Raingo, tareas en las que tengo experiencia (que se detallan a continuación) y estoy aprendiendo la técnica del Patch Clamp para la medida de corrientes de Calcio (I_{Ca}).

- Cultivo de las líneas celulares HEK293 y HEK293T, utilizadas en experimentos de co-transfección con plásmidos que expresan diferentes canales de Calcio voltaje operados (CaV) y posterior medida de I_{Ca} .
- Transformación de bacterias competentes con ADN plasmídico.
- Extracción de ADN plasmídico, medición de la concentración y pureza de los mismos mediante corte la lectura de absorbancia a diferentes longitudes de onda en un espectrofotómetro.
- Chequeo de la identidad de los plásmidos mediante digestión con enzimas de restricción y corridas electroforéticas en geles de agarosa.
- Verificación de la expresión de las proteínas codificadas por los plásmidos amplificados mediante transfección en líneas celulares, observación de las mismas en el microscopio de fluorescencia para aquellos que poseen un gen reportero.

En el anexo se adjunta la lista de plásmidos amplificados hasta la fecha de realización del informe.

7.2. TÉCNICAS EMPLEADAS.

7.2.1 CULTIVOS CELULARES.

Las células son cultivadas rutinariamente en botellas de 25 cm² de superficie en Medio Esencial Dulbecco Modificado (DMEM), suplementado con 10% (v/v) de suero fetal bovino (SFB). Las botellas se mantienen en una estufa de cultivo a 37°C, en atmosfera con 5% de CO₂. Los subcultivos se realizan en placas de 9,2 cm² de superficie. Para ello se retira el medio de cultivo de las botellas, se agregara 3 ml de solución cítrico salina y se procede a observar las células en un microscopio invertido. Una vez despegadas, se disgregan mecánicamente por pipeteo y se transfieren 0,5 ml de la suspensión celular a cada placa que contiene 1,5 ml de medio completo. Las placas son incubadas en iguales condiciones a las descritas para las botellas.

7.2.2 . TRANSFORMACIÓN DE BACTERIAS COMPETENTES.

Se adicionan aproximadamente 50 ng del ADN transformante a 200 µl del stock de bacterias competentes, manteniéndolos en hielo durante 30 minutos. El tubo se transfiere a un baño de agua a 42 °C para realizar un shock térmico de 90 segundos de duración, rápidamente se lo coloca en hielo, se incuba durante 10 minutos y luego se agregan 800 µl de Luria-Bertani (LB) y se incuba 1 h a 37 °C. posteriormente, las bacterias se siembran en placas con LB agar, suplementado con el antibiótico (ATB) de selección a la concentración correspondiente y se incuban a 37 °C durante toda la noche.

7.2.3 EXTRACCIÓN DE ADN PLASMÍDICO.

Se toma una colonia y se inoculan 5 ml de LB suplementado con el ATB de selección que posea el plásmido. Se incuba a 37°C por 8 hs aproximadamente con agitación vigorosa (300 rpm aprox.). A 200 ml de LB con ATB se agregan 0,5 ml del cultivo y se incuba a 37°C durante toda la noche con agitación vigorosa. Las bacterias se cosechan por centrifugación a 6000 g, 4 ° C durante 15 min. El sedimento bacteriano se resuspende en 20 ml de buffer P1y luego se añaden.20 ml de buffer P2, se mezcla bien por inversión (4-6 veces), y se incuba a temperatura ambiente durante 5 min. Posteriormente se adicionan 20 ml de buffer P3 frío y se mezcla inmediatamente por inversión (4-6 veces), y se incuba en hielo durante 30 min. y se centrifuga a 20.000 g durante 30 min. a 4 ° C. El sobrenadante que contiene el

ADN plasmídico se remueve, se centrifuga nuevamente a 20.000 g durante 15 min. a 4 ° C y se recupera el sobrenadante que contiene el ADN plasmídico

Una columna QIAGEN-tip 100 se equilibra mediante la aplicación 4 ml de buffer QBT que se deja fluir por acción de la gravedad. Luego, se aplica la solución de ADN que se deja escurrir por gravedad (el ADN se fija a la resina). Se lava la columna dos veces con 10 ml de buffer QC y posteriormente el ADN se eluye con 5 ml de tampón QF. El ADN eluido se precipita mediante la adición de 3,5 ml de isopropanol a temperatura ambiente, se mezcla y se centrifuga a 15.000 g durante 30 min. a 4 ° C, el sobrenadante se descarta cuidadosamente para no perturbar el ADN precipitado y se lava con 2 ml de etanol 70%, .se centrifuga a 15.000 g durante 10 min. El sobrenadante se descarta y el precipitado se deja secar durante 5-10 min., y finalmente se resuspende en la cantidad adecuada agua miliQ (70 µl aproximadamente).

7.2.4 DIGESTIÓN DE ADN PLASMÍDICO CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN (ER).

El ADN plasmídico se digiere con las ER correspondientes para su identificación siguiendo las instrucciones del proveedor (Promega o Fermentas) la reacción enzimática se lleva a cabo en un tubo de 0,5 ml conteniendo típicamente: 0,2 µg de ADN plasmídico, 1 µl del buffer de reacción (10X) adecuado, 1 a 2 unidades (U) de la ER y agua miliQ (c.s.p 10 µl). La mezcla de reacción se incuba a la temperatura óptima de la ER utilizada durante una hora. Se corrobora la digestión sembrando la mezcla del ADN plasmídico digerido en un gel de agarosa.

7.2.5 ELECTROFORESIS SUMERGIDA EN GELES DE AGAROSA.

La separación de fragmentos de ADN obtenidos por digestión con ER se lleva a cabo mediante electroforesis en geles de agarosa (0,8-1%) al que se le adiciona el volumen correspondiente de GelRed 10.000X (Biotium, 3159 Corporate Place Hayward, CA 94545) para visualizar el ADN. A las muestras se les adiciona la cantidad correspondiente de buffer de siembra para ADN 6X y se siembran en paralelo con estándares de peso molecular de ADN comerciales. En todos los casos el buffer de corrida fue TAE 1X. La corrida electroforética se realizó en cubas de electroforesis sumergidas, a aproximadamente 10 V/cm durante el tiempo requerido para la correcta separación de los fragmentos. Las bandas de ADN se observa a través de un transiluminador UV, se fotografiaron utilizando una cámara digital (Gel Doc™ XR, BioRad).

7.2.6 TRANSFECCIÓN DE CÉLULAS CON ADN PLASMÍDICO.

Para la transfección transitoria de las distintas construcciones se utilizan liposomas catiónicos comerciales (Lipofectamine 2000, Invitrogen), el ADN de interés y células HEK293 o HEK293T (dependiendo del promotor que controla la expresión del gen de interés) crecidas al ~80-90% de confluencia en placas de cultivo de 9,2 mm² de superficie. Se utiliza una mezcla de transfección con una relación 3,5 µg de ADN: 7 µl de lipofectamina2000, preparada de la siguiente manera:

Tubo 1: 3,5 µg de ADN + 100 µl de DMEM sin FBS ni antibiótico/antimicótico.

Tubo 2: 7 µl de lipofectamina2000+ 97 µl de DMEM sin SFB ni antibiótico/antimicótico.

Cada tubo se incuba por separado a temperatura ambiente durante 5 min.

Luego, se mezcla el contenido de ambos tubos, y se incuba a temperatura ambiente por 20 min. Durante ese tiempo se lavan las monocapas de células tres veces con 1 ml DMEM sin FBS ni antibiótico/antimicótico cada vez, para asegurar la eliminación completa de suero y/o antibiótico/antimicótico. Luego de los 20 minutos, se agrega la totalidad de la mezcla de transfección a la placa de células, se adiciona 2,3 ml de DMEM y se incuba a 37°C durante 4 hs. Pasadas ese tiempo se descarta el medio con la mezcla de transfección, se lo reemplaza por 2,5 ml de DMEM 10% FBS y se incuban las células durante 24 hs.

Si las células son utilizadas para evaluación de la expresión mediante microscopia de fluorescencia, estas son crecidas sobre un vidrio que se coloca dentro de la placa, luego de

todo el proceso las células son fijadas, el vidrio se retira de la caja y se monta sobre un portaobjetos para su posterior observación.

7.2.7 FIJACIÓN DE CÉLULAS.

El medio se descarta y se procede a realizar tres lavados con 2 ml de PBS 1X de 5 min., se descarta el líquido de lavado, se agregan 2 ml de paraformaldehído (PFA) 4% por 20 min., se retira el PFA y se realizan tres lavados 3 con 2 ml de PBS 1X de 5 min. Sobre el porta se coloca una gota de solución de montaje (SM) y sobre la misma se coloca el vidrio con las células fijadas haciendo contacto con la SM, se sella con esmalte, se deja secar.

7.2.8 MICROSCOPIA Y CAPTURA DIGITAL.

Los vidrios fijados se observan en un microscopio Nikon (Nikon Corporation Japan) con lentes múltiples neofluar-PH y óptica de campo claro, las imágenes se capturaron con una cámara fotográfica digital Nikon Digital Sight D5-U3 y software NIS-Elements, Versión 3.22.

7.2.9 PATCH CLAMP

La técnica de *patch-clamp* consiste brevemente en acercar una pipeta de vidrio de boro-silicato (conteniendo el electrodo de trabajo) a la membrana de la célula y mediante succión conseguir un sello de alta resistencia con la membrana. Luego, también mediante succión se rompe la membrana por debajo del sello logrando una comunicación entre el interior celular y el de la pipeta de *patch* obteniendo la configuración de *whole-cell* o célula entera. Utilizando la configuración de célula entera se registra la corriente total que pasa a través de todos los canales expresados en la membrana plasmática de la célula. Para esto, mediante el uso de un microamplificador, se fija el potencial de membrana y se aplica un pulso cuadrado de voltaje despolarizante. Las corrientes de calcio a través de canales de calcio operados por voltaje se registran en células HEK293 y HEK293T (las cuales no tienen canales de calcio endógenos) cotransfectadas con las subunidades formadoras del canal estudiado. Las corrientes se registran con el microamplificador de Patch Clamp L/M-EPC 7 y una placa conversora analógico-digital ITC-16. Los datos se adquieren y analizan con PATCHMASTER (HEKA Elektronik). Para el análisis de los datos se utiliza el programa OriginLab 8.

8. OTRAS ACTIVIDADES

8.1 PUBLICACIONES, COMUNICACIONES, ETC. Debe hacerse referencia, exclusivamente, a aquellas publicaciones en las cuales se ha hecho explícita mención de la calidad de personal de apoyo de la CIC. Toda publicación donde no figure dicha aclaración no debe ser adjuntada. Indicar el nombre de los autores de cada trabajo en el mismo orden en que aparecen en la publicación, informe o memoria técnica, año y, si corresponde, volumen y página, asignándole a cada uno un número.

8.2 CURSOS DE PERFECCIONAMIENTO, VIAJES DE ESTUDIO, ETC. Indicar la denominación del curso, carga horaria, institución que lo dictó y fecha, o motivos del viaje, fecha, duración, instituciones visitadas y actividades realizadas.

8.3 ASISTENCIA A REUNIONES CIENTÍFICAS/TECNOLOGICAS o EVENTOS SIMILARES. Indicar la denominación del evento, lugar y fecha de realización, tipo de participación que le cupo y título(s) del(los) trabajo(s) o comunicación(es) presentada(s).

9. TAREAS DOCENTES DESARROLLADAS EN EL PERIODO.

Durante el periodo informado he cumplido las tareas correspondientes al cargo de Ayudante diplomado rentado con dedicación simple en la Cátedra de Genética de la Facultad de Ciencias Médicas de la UNLP

10. OTROS ELEMENTOS DE JUICIO NO CONTEMPLADOS EN LOS TITULOS ANTERIORES.

Participación en la Semana de la Ciencia y la Tecnología. 12 al 18 de Junio.

ANEXO SOLUCIONES

Cítrico salina

10 g/l de KCl, 4,4 g/l de citrato de sodio

Luria-Bertani (LB)

10 g/l Triptona; 5 g/l extracto de levadura; 10 g/l NaCl; pH 7

LB agar

10 g/l Triptona; 5 g/l extracto de levadura; 10 g/l NaCl; 15 g/l agar agar; pH 7

Buffer P1

50 mM Tris·Cl, pH 8.0; 10 mM EDTA; 100 µg/ml RNasa A

Buffer P2

200 mM NaOH; 1% SDS (% p/v)

Buffer P3

3 M Acetato de Potasio, pH 5.5

Buffer QBT

750mM NaCl; 50 mM MOPS, pH 7.0; 15% isopropanol (% v/v); 0,15 % Triton® X-100

(%v/v)

buffer QC

1 M NaCl; 50 mM MOPS, pH 7.0; 15% isopropanol (%v/v)

buffer QF

1.25 M NaCl; 50 mM Tris-Cl, pH 8.5; 15% isopropanol (%v/v)

TAE 1X

40 mM Tris-acetato; 1 mM EDTA

Buffer de siembra para ADN 6X

0,25% p/v azul de bromofenol; 0,25% p/v xileno cianol; 30% glicerol

PBS 1X

8 g/l NaCl; 0.2 g/l KCl; 1.44 g/l Na₂HPO₄; 0.24 g/l KH₂PO₄; pH 7.4.

PFA 4%

40g/l paraformaldehido en PBS

SM

10 mg/ml DABCO™; 5 µg/ml Hoechst 33342; 50 % glicerol (% v/v); 50% PBS 1X (% v/v)

ANEXO IMÁGENES

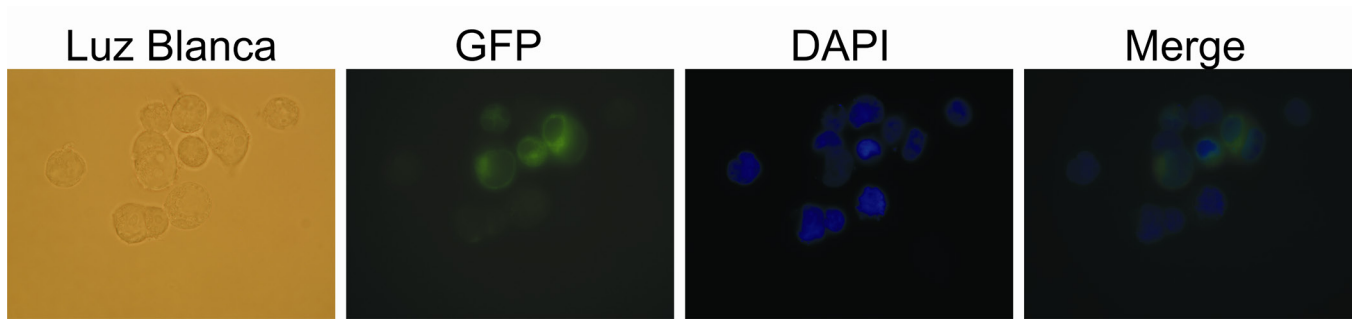


Figura 1: Expresión de CaV2.1eGFP en cultivos de células HEK 293T. Las células fueron co-transfectadas con los plásmidos que expresa el CaV2.1eGFP, las subunidades CaV α 2 δ 1 y CaV β 3, posteriormente fijadas y observadas al microscopio de fluorescencia para corroborar la expresión del gen reportero. Objetivo X100

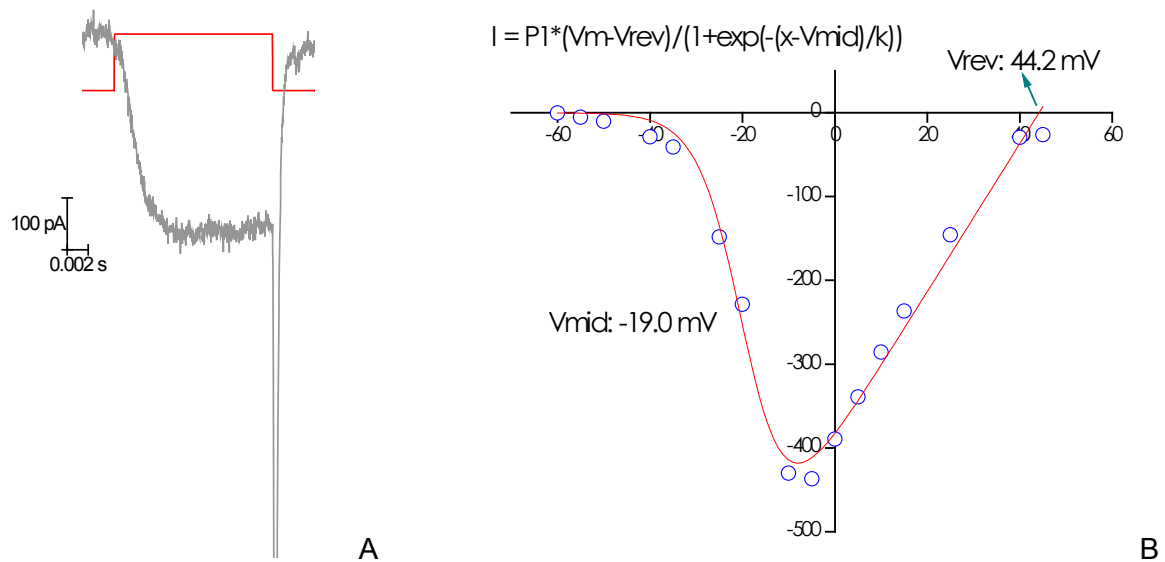


Figura 2: Registro corriente de Calcio del CaV2.1eGFP en células HEK 293T. A, ejemplo de corriente evocada a -10mV a partir de un potencial de reposo de -100mV. B, ejemplo de curva IV con potencial de reposo a -100mV.

ANEXO PLÁSMIDOS AMPLIFICADOS

Plásmido	Rendimiento(ng/μl)
pcDNA3.1-GHSRIa	382.1
pcDNA3.1-GHSRIaA204E	404.4
pcDNA3.1-HA-GHSRIa	372.3
pcDNA3.1-HA-GHSRIaA204E	277.5
pcDNA3.1-GHSRIa-YFP	319.4
pcDNA3.1-GHSRIaA204E-YFP	384.8
pcDNA3.1-HA-GHSRIa-YFP	401.7
pcDNA3.1-HA-GHSRIaA204E-YFP	388.4
L307-MC4R	338.9
pcDNA6/V5-HisA-CaV2.2e[Δa10, Δ18a,Δ24a, 31a, 37b]	465,8
pcDNA6-CaV2.1	485.7
pcDNA3.1(+) (Hygro)-CaVα2δ-1	521.8
pcDNA3.1(+) (Zeocin)-CaVβ3	454.7
pcDNA3.1(+) (Zeocin)-CaVβ2	463.2
CaV2.1eGFP	462.7