



TÍTULO: Manipulación génica de células humanas de hepatocarcinoma HepG2 y sus efectos.

PROFESOR RESPONSABLE: Carmen Alicia Padilla Peña

MACROÁREA DE CONOCIMIENTO: Ciencias de la Salud

RESUMEN: (200 palabras)

Este proyecto pretende iniciar a los alumnos de bachillerato interesados en Biociencias en las técnicas utilizadas en la actualidad para modificar genéticamente organismos modelo. Mediante estas técnicas se pueden insertar, eliminar o cambiar genes en un organismo, y son la base de estudio de un gran número de proyectos de investigación encaminados a resolver problemas tanto del ámbito de la salud como del biotecnológico.

En este proyecto se explicará en el laboratorio cómo se consigue eliminar un gen concreto de células humanas de hepatocarcinoma (HepG2) mediante la metodología CRISPR/Cas9. A continuación, se trabajará con estas células a las que se les ha eliminado el gen de la peroxirredoxina 6 humana (Prdx6), que se ha relacionado con cáncer. Se comprobará mediante la técnica de Western-blot que estas células “knockout” no expresan el gen. Además, se analizará alguna consecuencia fenotípica de esta mutación, como es la entrada de glucosa en la célula. Se ha descrito que las células cancerosas asimilan más glucosa que las normales por lo que es interesante comprobar esta característica en nuestra línea celular carente de Prdx6 en comparación con las células tumorales HepG2. También se determinará el nivel de proliferación celular en ambos tipos de células.



PROFESORES PARTICIPANTES:

NOMBRE: Raquel Requejo Aguilar
CARGO: Investigadora Postdoctoral
DEPARTAMENTO: Bioquímica y Biología Molecular
FACULTAD: Ciencias
CONTACTO: bb2reagr@uco.es

NOMBRE: María José López Grueso
CARGO: Investigadora Predoctoral
DEPARTAMENTO: Bioquímica y Biología Molecular
FACULTAD: Ciencias
CONTACTO: q02logrm@uco.es

NOMBRE: Daniel José Lagal Ruiz
CARGO: Investigador Predoctoral
DEPARTAMENTO: Bioquímica y Biología Molecular
FACULTAD: Ciencias
CONTACTO: b32larud@uco.es



OBJETIVOS: (General y específicos)

Objetivo general.- Este proyecto pretende iniciar a los alumnos de bachillerato interesados en Biociencias en técnicas utilizadas en la actualidad para modificar genéticamente líneas celulares humanas y su posterior análisis y comprobación.

Para alcanzar este objetivo general se plantean los siguientes objetivos específicos:

1. Aprendizaje del manejo del material básico de un laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular.
2. Aprendizaje mediante herramientas interactivas de técnicas de manipulación génica de líneas celulares humanas y animales de experimentación.
3. Aprendizaje de recogida de medios de cultivo y células HepG2 mediante tripsinización.
4. Aprendizaje del conteo de células usando la cámara de Neubauer y azul tripán para calcular la viabilidad celular.
5. Conocimiento y utilización de la técnica de separación electroforética de proteínas en gel de acrilamida desnaturalizante (SDS-PAGE). Se utilizará para separar las proteínas de las células recogidas anteriormente.
6. Conocimiento y utilización de la técnica de Western-Blot para identificar la proteína Prdx6 humana en las células recogidas. Las proteínas separadas mediante SDS-PAGE son transferidas a una membrana de nitrocelulosa, en la que se va a intentar detectar la proteína Prdx6 mediante el uso de anticuerpos específicos.
7. Determinación de los niveles de glucosa en medios de cultivo.



RECURSOS: (Aulas, laboratorios, equipamiento)

Para llevar a cabo este proyecto disponemos de los laboratorios del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular equipados con todo el material necesario para alcanzar los objetivos propuestos. También se utilizará de forma esporádica el laboratorio del grupo de investigación BIO-216, así como aulas de trabajo preparadas para la puesta en común y análisis de los resultados obtenidos. Todos ellos localizados en el edificio Severo Ochoa del Campus de Rabanales.

Equipamiento del Laboratorio de prácticas de Bioquímica y Biología Molecular

Micropipetas y puntas, vasos de precipitado, probetas, tubos eppendorf, termobloques, campanas de flujo laminar, campanas de extracción de gases, microscopio, centrifugas, equipamiento para electroforesis de proteínas, sistema de transferencia semiseca, fuentes de alimentación, cubetas, espectrofotómetros.

Equipamiento del Laboratorio de investigación del grupo BIO-216

Equipamiento para la preparación y esterilización de material de laboratorio, campanas de flujo laminar, incubador de CO₂, microscopio, sistema para visualización y análisis de los resultados del Western-Blot.

Equipamiento del Aula de trabajo

Video-proyector y ordenador portátil para las presentaciones.



DESCRIPCIÓN DE LA ACTIVIDAD: (Máximo 5 hojas)

Cronograma detallado de la actividad

Primera sesión

Presentación del proyecto por parte de los Profesores responsables del proyecto.

Segunda sesión

Lugar: Laboratorio 1-2 del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Laboratorio del Grupo BIO-216 y Aula de trabajo.

Objetivos: Se abordarán completamente los objetivos 1, 2, 3 y 4, y se iniciará el objetivo 5.

Recursos y consumibles necesarios: Se detallará en los protocolos entregados a los alumnos antes de cada sesión.

Actividades que desarrollar:

- Presentación detallada del proyecto en el aula de trabajo.
- Familiarización con el uso del material de un Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular.
- Visualización de células HepG2 normales y “knockout” para Prdx6 al microscopio.
- Recogida de medio de cultivo y de las células de los frascos de cultivo.
- Contaje de las células vivas y muertas mediante la cámara de Neubauer y azul tripán. Cálculo de la viabilidad celular.
- Preparación de geles de poliacrilamida para la electroforesis de la sesión siguiente.

Tercera sesión

Lugar: Laboratorio 1-2 del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular.

Objetivos: Se acabará el objetivo 5 y se iniciará el 6.

Recursos y consumibles necesarios: Se detallará en los protocolos entregados a los alumnos antes de cada sesión.

Actividades que desarrollar:

- Preparación de las muestras para la electroforesis.
- Aplicación de las muestras en los pocillos del gel de poliacrilamida e inicio de la electroforesis, que se dejará transcurrir durante 1 hora.
- Preparación del material necesario para la transferencia semiseca.
- Transferencia de las proteínas del gel de acrilamida a la membrana de nitrocelulosa mediante un sistema de transferencia semiseca.
- Bloqueo de la membrana de nitrocelulosa con leche en polvo.
- Incubación con el anticuerpo primario anti-Prdx6 hasta la sesión siguiente.



Cuarta sesión

Lugar: Laboratorio 1-2 del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Laboratorio del Grupo BIO-216 y Aula de trabajo.

Objetivos: Se completará el objetivo 6 y se abordará completamente el 7.

Recursos y consumibles necesarios: Se detallará en los protocolos entregados a los alumnos antes de cada sesión.

Actividades desarrollar:

- Incubación de la membrana de nitrocelulosa con el anticuerpo secundario
- Revelado de la membrana y análisis de los resultados en el sistema de análisis de imagen del Grupo BIO-216
- Determinación de glucosa en los medios de cultivo recogidos en la segunda sesión.
- Análisis de los resultados y conclusiones.

Quinta sesión

Los alumnos participarán primero en una sesión específica en las que se les enseñará a tratar, analizar y presentar los resultados obtenidos de acuerdo con el método científico. Posteriormente, en formato powerpoint, los alumnos presentarán al resto de participantes los resultados obtenidos en su trabajo, comentando sus impresiones sobre la experiencia desarrollada.

Día	Lunes	Martes	Miércoles	Jueves	Viernes
P L A N	Inauguración campus Presentación Proyectos				Trabajo en aula convencional y/o de informática
O B J E T O	Organización de los grupos de trabajo				Aprender a tratar, analizar y presentar los resultados



REFERENCIAS