



SERVICIOS SAI APOYO INVESTIGACIÓN

CITOMETRÍA | ANIMALARIO
PROTEÓMICA | MICROSCOPIA
OTRAS UNIDADES TÉCNICAS

UNIDAD DE INVESTIGACIÓN DEL
HOSPITAL NACIONAL DE PARAPLÉJICOS
Catálogo de Servicios Científico - Técnicos

ÍNDICE

1. Presentación

2. SAI-Animalario y Cirugía Experimental

3. SAI-Microscopía y Análisis de Imagen

4. SAI-Citometría de Flujo

5. SAI-Proteómica

6. Otras Unidades Técnicas

- Unidad de Vesículas Extracelulares (UVEx)
- Unidad de Cultivos Celulares
- Unidad de Ingeniería y Evaluación Motora (UIEM)

Presentación

La Unidad de Investigación del Hospital Nacional de Parapléjicos de Toledo (UdI-HNP) (<http://hnparaplejicos.sescam.castillalamancha.es/es/profesionales/investigacion>) constituida sobre cuatro décadas de experiencia clínica en la lesión medular y sus trastornos asociados, tiene como misión crear, adaptar, trasladar, difundir y divulgar conocimiento científico sobre la fisiología y las patologías relacionadas con el sistema nervioso lesionado, y sobre nuevas intervenciones terapéuticas dirigidas a curar o mejorar la calidad de vida de las personas afectadas por estas patologías. Para ello, tiene como objetivo generar una infraestructura científica que permita estudiar la lesión medular y patologías neurológicas relacionadas desde perspectivas moleculares, celulares, tisulares y funcionales, como base para el desarrollo y evaluación de tratamientos terapéuticos en pacientes.

Además de la masa crítica investigadora, la mayor fortaleza de nuestro centro son las plataformas científico-técnicas conformadas por los SAI-HNP, ya que ponen a disposición de los investigadores e investigadoras, todo un abanico de recursos, infraestructuras, equipamiento y tecnologías de vanguardia integradas en un único lugar, con el fin de facilitar el desarrollo de sus proyectos de investigación.

El conjunto de SAIs del HNP cuenta además, con un grupo de tecnólogos expertos que proporcionan asesoramiento científico y técnico a los investigadores, tanto en las técnicas ofertadas actualmente en los SAI-HNP como en nuevas técnicas de posible implementación.

Por otro lado, en un mundo tan cambiante como es el mundo de la ciencia y la investigación, se hace más necesaria aún la adquisición de nuevos conocimientos sobre distintas técnicas y tecnologías, el uso de determinadas herramientas útiles en investigación, así como la actualización de conocimientos según los avances científicos. Con el fin de proporcionar formación especializada

impartida por expertos, los SAIs participan en el programa de formación continuada del Hospital Nacional de Parapléjicos-SESCAM, así como a través de su Fundación impartiendo cursos de carácter teórico-práctico, acreditados por el Instituto de Ciencias de la Salud de Castilla-La Mancha. Estos cursos van dirigidos a especialistas, clínicos, investigadores y personal técnico interesados en aumentar su conocimiento en las técnicas de microscopía, citometría de flujo, proteómica y sus potenciales aplicaciones a sus campos de interés. Anualmente, se imparten cursos de Capacitación para trabajar con animales de investigación acreditado por la Consejería de Agricultura de la Junta de Comunidades de Castilla-La Mancha. De igual forma se imparten cursos abiertos a nivel nacional y existen convenios con universidades para la realización de prácticas en nuestras instalaciones.





SAI-Animalario y Cirugía Experimental

Responsable: Enrique Páramo Rosel.
Correo electrónico: eparamo@sescam.jccm.es
Teléfono: 925 247 785

El Servicio de Animalario y Cirugía experimental (SACE) es una instalación del Hospital Nacional de Parapléjicos, dependiente del SESCAM. Desde el SACE se pone a disposición de los grupos de investigación del HNP, el equipamiento y la experiencia de su personal para todo lo relacionado con el animal de laboratorio. Ofrece sus servicios a la Unidad de Investigación del Hospital, así como a otros centros públicos y privados, a nivel nacional.

Principales campos de aplicación

- Los servicios que ofrecemos abarcan los siguientes campos:
- Cría y mantenimiento de roedores. Somos centro usuario, de cría y suministrador. Instalación con status sanitario según la sociedad FELASA
- Mantenimiento de porcino
- Gestión cruces de cruces y mantenimiento de colonias en roedores
- Asesoramiento en bienestar animal con especialista en este campo in situ
- Servicio de anestesia en las especies roedor, porcino y ovino
- Servicio de esterilización a vapor y gas
- Servicio de Ecografía
- Creación de modelos animales de investigación, principalmente quirúrgicos
- Comité Ético de Experimentación Animal y Órgano Habilitado a nivel nacional para evaluación de proyectos con animales
- Docencia
 - o Cursos de capacitación para trabajar con animales
 - o Cursos, Jornadas y Congresos en distintos campos de la cirugía experimental

Instrumentación

• Unidades quirúrgicas de grandes animales

Disponemos de 3 puestos de anestesia con mesas de anestesia con respirador, monitor de gases, monitorización de paciente, mesa y lámpara quirúrgica.

• Unidades quirúrgicas de roedores

Disponemos de 6 puestos con fuente de luz fría, manta térmica y lupa quirúrgica, con posibilidad de anestesia gaseosa o parenteral.

• Ecógrafo

Marca Esaote, con sonda lineal 18-24MHz y convex de 3,5-7 MHz. Permite realizar diagnósticos de gestación a ratones a partir del día 7.

• Equipo de captura de movimiento para variables cinemáticas y cinéticas

La captura de movimiento mediante marcadores proporciona de manera precisa las posiciones de las diferentes extremidades y partes de cuerpo, por lo tanto permite la creación de modelos biomecánicos que describen el comportamiento el aparato locomotor del animal.

• Catwalk

Catwalk es un sistema basado en video que permite el análisis de la locomoción en pequeños roedores mediante la evaluación dinámica de las huellas de las pisadas.

• Campo abierto BBB

La escala de calificación locomotora de Basso-Beattie-Bresnahan (BBB) es una escala de 21 puntos desarrollada originalmente para su uso en modelos de lesión medular toracolumbar de rata.³ La BBB discrimina las fases de recuperación según la gravedad de la lesión y/o el tiempo después de la lesión, dos características importantes de la recuperación clínica.

• Tapiz rodante

Las pruebas realizadas sobre un tapiz rodante con control de velocidad permiten evaluar la resistencia al ejercicio forzado de pequeños roedores. También se pueden utilizar para rehabilitar o entrenar a los animales.

• Rotarod

La técnica "Rota-Rod" evalúa la coordinación motora. Desde que UGO BASILE comercializó su primer Rota-Rod, basado en un estudio de N.W. Dunham (1957), miles de "papers" han sido publicados proporcionando gran valor en el campo de investigación de sustancias que son potencialmente activas en la coordinación motora. El animal se tiene que mantener sobre un rodillo que gira

con una velocidad determinada. Cuando el animal cae activa un interruptor que registra tiempo de aguante sobre el rodillo. El aparato permite la configuración de diversos parámetros como la rampa de velocidad entre otros.

• Escalera horizontal

La prueba de la escalera horizontal es una prueba motora y de coordinación para evaluar la habilidad de la locomoción en ratas y ratones. Los pasos se cuentan y clasifican como colocación correcta/funcional de la pata, un deslizamiento o un error.

• Versamax

Se trata de un Open Field evolucionado para la evaluación de la actividad motora, compuesto por una cámara de plexiglás transparente (ancho 40 cm, largo 40 cm, alto 30,5 cm) y una tapa transparente con orificios de ventilación. El movimiento del animal se registra mediante una cuadrícula de rayos infrarrojos ubicados en los cuatro lados de la cámara para la actividad horizontal (16 rayos igualmente espaciados a 2,54 cm y 4,5 cm de la base) y una segunda cuadrícula de rayos ubicada en dos lados de la cámara para la actividad vertical (16 rayos a 16 cm de la base).

• Medidor de la fuerza de empuñadura

Mediante esta técnica se puede valorar el efecto de drogas, toxinas, relajantes musculares, enfermedad, edad o daño neurológico sobre la función muscular.

• Von Frei automático

Valora automáticamente la sensibilidad al tacto en la superficie plantar de ratas y ratones. El actuador de fuerza se coloca debajo de la superficie plantar del animal y se aplica la fuerza con una velocidad (rampa) preestablecida mediante un filamento rígido tipo Von Frey de 0,5 mm.

• Hargreaves

Este equipo evalúa la sensibilidad térmica plantar mediante una luz focalizada procedente de una fuente de calor radiante. Está compuesto por un cabezal estimulador, un bastidor que soporta un vidrio con filamentos calefactores, una unidad electrónica de control y un set de cajas contenedoras de animales para la experimentación.

• Randall-selitto

La prueba de Randall-Selitto o prueba de presión de la pata es una técnica para medir la respuesta al dolor en animales. Se utiliza en la investigación básica del dolor y para probar la eficacia de los analgésicos.



SAI-Microscopía y Análisis de Imagen

Responsables: Dr José Ángel Rodríguez Alfaro.
Dr Javier Mazarío Torrijos.

Correo electrónico: microscopia.hnp@sescam.jccm.es
Teléfono: 925 396 830

El Servicio de Microscopía y Análisis de Imagen (SMAI) es una instalación del Hospital Nacional de Parapléjicos, dependiente del SESCAM. Desde el SMAI se pone a disposición de los grupos de investigación del HNP el equipamiento y la experiencia de su personal para la captura y análisis de imágenes de muestras biológicas y de materiales. Bajo determinadas condiciones, también puede ofrecer su soporte a otras instituciones públicas y empresas privadas del entorno.

Principales campos de aplicación

En el SMAI se realiza de manera rutinaria adquisición de superimágenes de grandes áreas (campo claro y fluorescencia), high content analysis, captura de imágenes de fluorescencia en muestras con hasta 7 fluorocromos, estudios de migración celular, de colocalización, disección selectiva de regiones específicas de tejido para análisis de ARN o proteínas, y procesamiento y análisis de imágenes digitales. Además el SMAI está equipado para realizar estudios de FRAP y FRET.

Instrumentación

- **Microscopio invertido Olympus IX83 para high content analysis y mosaicos de imágenes de grandes áreas:** El microscopio IX83 está completamente motorizado y equipado con una fuente de iluminación LED para fluorescencia de 7 canales que cubren el rango del ultravioleta al infrarrojo. También cuenta con 6 filtros de emisión en una rueda rápida de filtros. La combinación de las

líneas de excitación y los filtros de emisión permite emplear una gran variedad de marcadores fluorescentes que se pueden muestrear a gran velocidad. Las imágenes se adquieren con una cámara Hamamatsu Orca 4.0.

El software ScanR convierte este equipo en una plataforma de high content analysis permitiendo realizar múltiples fotografías a diferentes longitudes de onda en placas de cultivo de 6 a 384 pocillos y en portas de forma rápida y automática y, de manera simultánea, el análisis de estas imágenes.

Con el software CellSensDimensions podemos capturar automáticamente mosaicos de imágenes de grandes áreas a alta resolución hasta en 4 portas de manera simultánea.

Ambos paquetes informáticos cuentan con licencias para deconvolución 2D, 3D y análisis de imagen por inteligencia artificial de última generación.

Objetivos: UPLXAPO4X/0.16, UPLXAPO10X/0.40, UPLXAPO20X/0.80, UPLXAPO40X/0.95, UPLXAPO40XO/1.40, UPLXAPO60XO/1.42, LUCPLFLN20XPH/0.45, LUCPLFLN40XPH/0.60

Filtros: Amplia gama de filtros que permiten la visualización de los marcadores fluorescentes habituales en investigación.

- **Microscopio confocal Leica TCS SP5:** El microscopio confocal Leica TCS SP5 está equipado con nueve líneas de excitación, cuatro canales de detección simultáneos (tres detectores para reflexión y/o fluorescencia y otro para luz transmitida) y un sistema AOBS (Acousto-Optical Beam Splitter).

Láseres: Diodo UV 405 nm, Argón multilineal 458, 476, 488, 496 y 514 nm, Helio-Neón 543 nm, Helio-Neón 594 nm, Helio-Neón 633 nm.

Objetivos: 10x PH1; HC PL APO 20x/0.70 CS; HCX PL APO 40x/1.25-0.75 oil CS; HCX PL APO 63x/1.4-0.6 oil HCX; PL APO 63x/1.3 glicerol Corr CS.

- **Microscopio confocal Leica TCS SP5 de escaneo rápido:** El microscopio confocal Leica TCS SP5 está equipado con múltiples líneas de excitación, cuatro canales de detección simultáneos (tres detectores para reflexión y/o fluorescencia y otro para luz transmitida) y un sistema AOBS (Acousto-Optical Beam Splitter). Microscopio con platina totalmente motorizada que permite hacer fotografías en mosaico y grabar posiciones para escanear a diferentes tiempos. Este confocal está equipado con el módulo de escaneo rápido (resonant scanner), especialmente diseñado para captación in vivo y estudios de dinámica a elevada velocidad.

Láseres: Diodo UV 405 nm, DPSS 561 nm, Helio-Neón 633 nm, Láser blanco (supercontinuo) sintonizable entre 470 y 670 nm.

Objetivos: FL PLAN 5x/0.12; PL APO 10x/0.4; PL APO 20x/0.70 CS; PL APO 40x/1.25-0.75 oil CS; PL APO 63x/1.4-0.6 oil CS; PL APO 63x/1.3 glicerol Corr CS.

- **Microdisector láser Leica LMD 6000:** El LMD 6000 es un sistema de microdisección compuesto por un microscopio Leica completamente automatizado acoplado a un láser de diodo UV de estado sólido de alta potencia a 355 nm y con un sistema de recogida de muestras por gravedad que evita el uso de fuerzas adicionales que puedan dañar la muestras diseccionadas. Permite la disección de especímenes o tejidos microscópicos para aislar fragmentos homogéneos y más pequeños de la muestra para su posterior análisis o cultivo (en el caso de muestras vivas). Equipado con iluminación de fluorescencia y filtros para DAPI, FITC y TEXAS RED.

Objetivos: PL FLUO 1.25x/0.04; UVI MICRODIS 6.3x/0.3; PL FLUO 20x/0.4; PL FLUO 40x/0.6 air; PL FLUO 63x/0.7 air.

- **Microscopio de epifluorescencia DM 5000B Leica:** Es un microscopio especialmente pensado para técnicas de fluorescencia, aunque también se pueden observar con técnicas de luz transmitida. Está equipado con una cámara digital monocroma de ultra alta sensibilidad Leica DFC 350 FX.

Objetivos: FL PLAN 5x; HCX PL S-APO 10x/0.30; HCX PL S-APO FLUOTAR 20x/0.50; HCX PL APO 40x/0.85 CORR; HCX PL APO 100x/1.40-0.70 oil.

Filtros: Amplia gama de filtros que permiten la visualización de los marcadores fluorescentes habituales en investigación.

- **Microscopio Leica DMI 6000B para célula viva (VTL):** Microscopio automático e invertido con platina motorizada y preparado para experimentos de célula viva (video time-lapse). Puede realizar capturas con luz transmitida (campo claro y contraste de fases) y con fluorescencia de luz incidente. Está equipado con una cámara digital monocroma de ultra alta Sensibilidad Leica DFC 350 FX.

Objetivos: N PLAN 5x/0.12; HC PL FLUOTAR 10x/0.30 PH; HCX PL FLUOTAR 20x/0.40 CORR PH; HCX PL FLUOTAR 40x/0.60 CORR PH 2 XT

Filtros disponibles: Amplia gama de filtros que permiten la visualización de los marcadores fluorescentes habituales en investigación.

- **Microscopio Olympus BX61 para estereología y mapeo anatómico:** Microscopio con platina y enfoque motorizados. Está equipado con una cámara digital a color refrigerada de 12 bits y 12,5 megapíxeles Olympus DP71 y una cámara a color MBF CX9000. El sistema cuenta con una licencia para el programa informático para estudios de estereología newCAST y con otra licencia para el programa informático NeuroLucida de mapeo anatómico y trazado de neuronas.

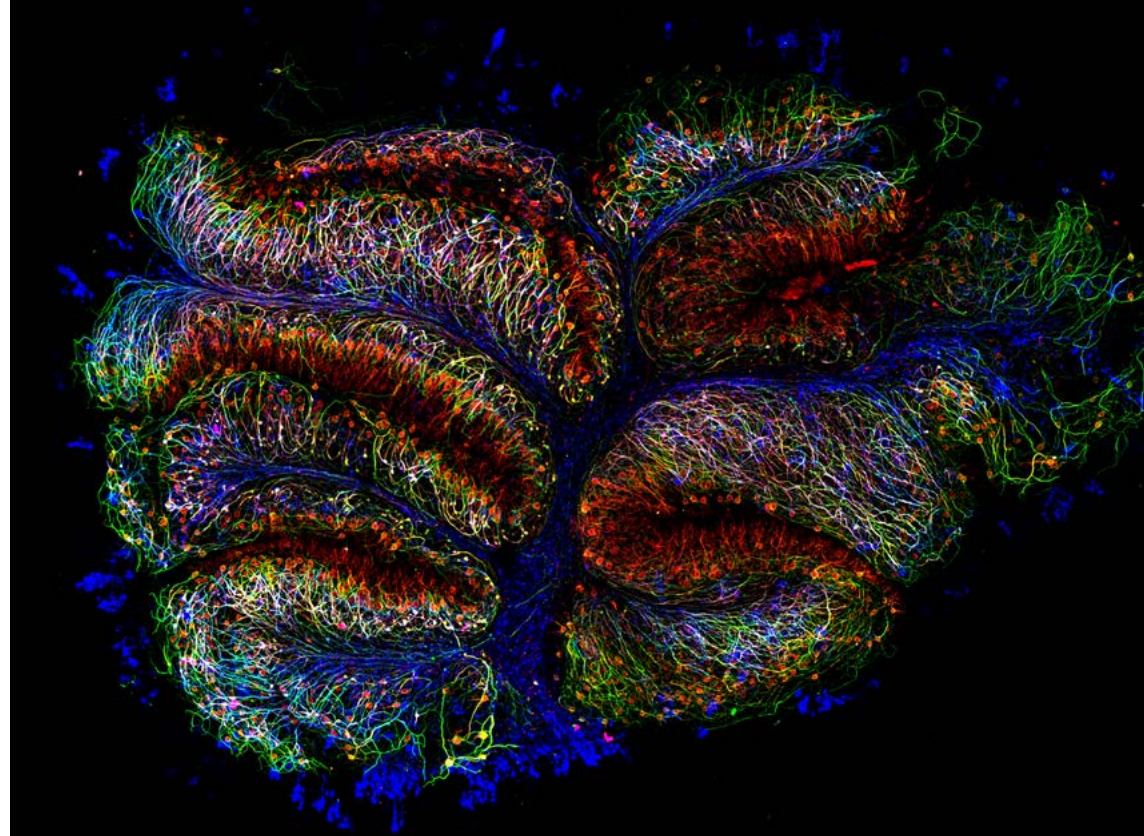
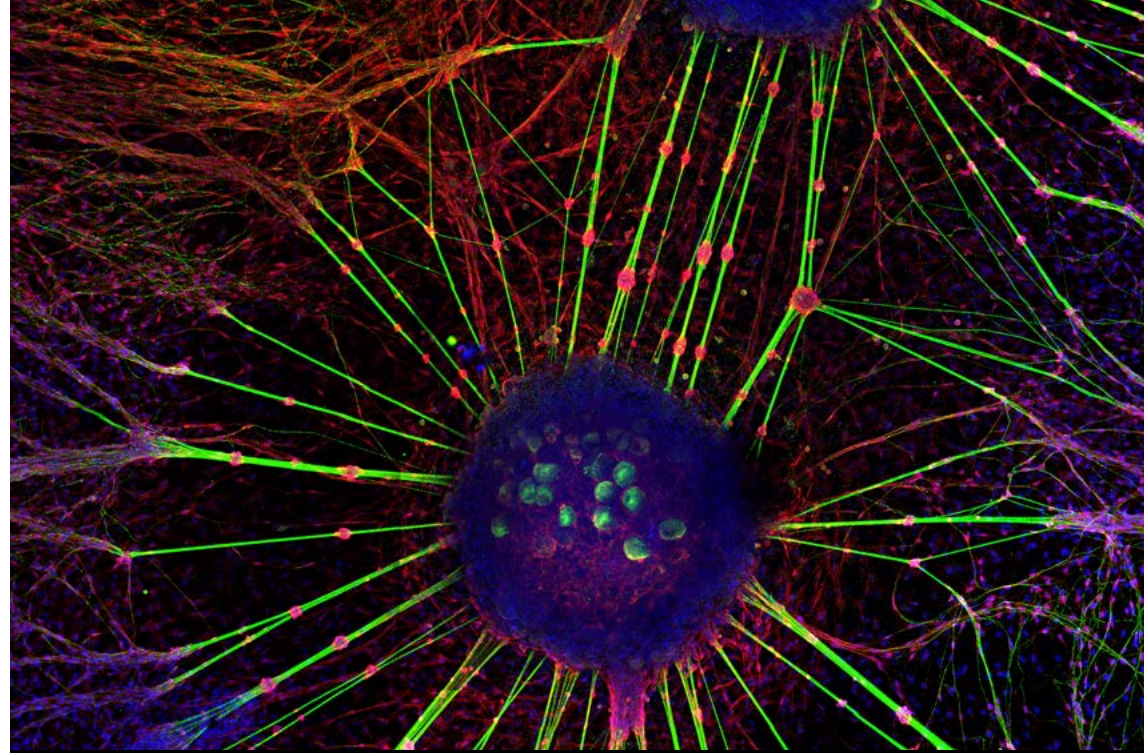
Objetivos: PlanApo N 2x/0.08; UPlanSapo 4x/0.16; Plan N 10x/0.25; UPlanSapo 20x/0.75; UPlanSApo 40x/0.95; UPlanSApo 100x/1.40 oil.

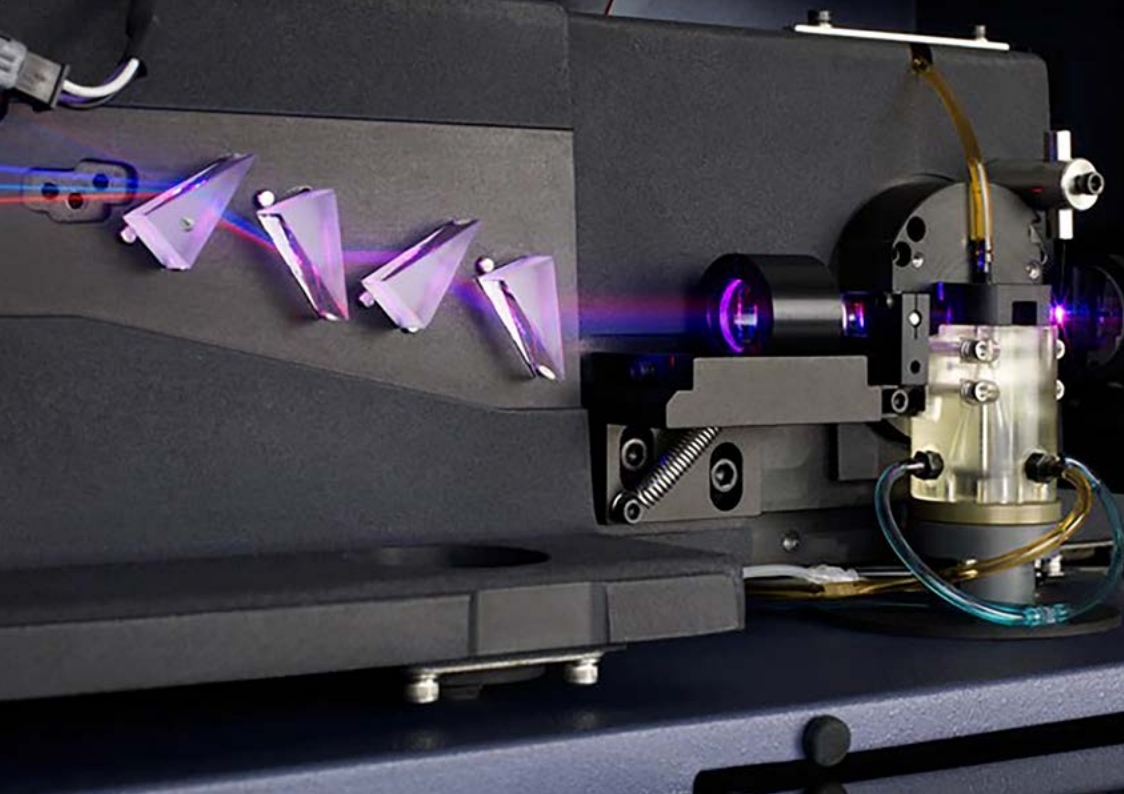
- **Lupa de fluorescencia multizoom AZ100 Nikon:** El microscopio AZ100 combina las ventajas de un microscopio estereoscópico o lupa (con gran campo visual y largas distancias de trabajo) y las de un microscopio tradicional permitiendo la obtención de imágenes macro y micro de alta resolución. Acoplada a la lupa tenemos una CCD de alta resolución en color DS-RI1 de Nikon. Esta lupa es muy útil para fotos de magnificación media, como sería la comprobación de transgénicos, cortes histológicos y cultivos.

Objetivo: AZ-Plan Apo 1x, AZ-Plan Fluor 2x N. 0.2 WD 45 y AZ-Plan Fluor 5x NA 0.5 WD 15 todos de larga distancia focal.

Factor de zoom de la vía óptica: de 1x a 8x en continuo con un mecanismo de parada en cada uno de los niveles de zoom (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, y 8) para que los aumentos puedan ser reproducibles.

Técnicas de iluminación: La lupa está equipada con una fuente de luz de mercurio para iluminación de fluorescencia y un revólver con los diferentes filtros; DAPI, CFP, FITC o GFP, Cy3 o TRITC y Texas Red. Además cuenta con gran cantidad de opciones de iluminación con luz transmitida (campo claro, luz polarizada, luz oblicua y DIC).





SAI-Citometría

Responsable: Dra Virginia Vila del Sol.
Correo electrónico: citometria.hnp@sescam.jccm.es
Teléfono: 925 396 833

Principios de la técnica

La Citometría de Flujo es una tecnología de análisis celular, que permite la caracterización de distintas poblaciones y subpoblaciones celulares en base a la cuantificación simultánea de distintas propiedades fenotípicas, bioquímicas y/o moleculares de las mismas. Este análisis multiparamétrico se realiza mediante el marcaje de las células con distintas sondas y/o anticuerpos fluorescentes específicos de uno o varios parámetros celulares, y se adquiere y analiza en un citómetro de flujo a velocidades de miles de células/segundo. Como complemento al análisis multiparamétrico, la separación celular por citometría de flujo o "cellsorting" permite la separación física de partículas en base a la expresión diferencial de uno o varios parámetros analizables por técnicas de citometría de flujo analítica.

Principales campos de aplicación

En el SAI Citometría, proporcionamos el equipamiento necesario para la realización de ensayos multiparamétricos de distinta índole, y para la separación de poblaciones celulares a partir de muestras complejas. Asimismo, damos soporte a los investigadores del centro, tanto básicos como clínicos, en lo que respecta al diseño, realización, análisis e interpretación de experimentos realizados mediante citometría de flujo. Además, podemos ofrecer estos servicios a otras instituciones públicas y empresas privadas del entorno.



Tipos de ensayo

- Inmunofenotipaje: marcaje extracelular y/o intracelular con anticuerpos conjugados con fluorocromos. Análisis multiparamétrico de hasta 13 colores.
- Análisis de ciclo celular (Ioduro de propidio, VybrantDyeCycle™).
- Análisis de expresión de genes indicadores/reporteros (GFP y variantes).
- Medida de proliferación celular (Tag-ItViolet, CFSE, incorporación de BrdU).
- Ensayos de apoptosis (Anexina V, fase sub-G1).
- Ensayos "multiplex" para moléculas solubles (ej. Citoquinas).
- Análisis funcional: estado redox, fagocitosis, lípidos.
- Separación celular activada por fluorescencia (FACS) separación de eventos raros a alta velocidad, separación de células frágiles, etc. Posibilidad de separar hasta cuatro poblaciones distintas, además de separar en placas multipocillo o en portaobjetos. Control de T^a.
- Separación de célula única en placas multipocillo para Single CellAnalysis
- Separación celular magnética: Sistema MiltenyiBiotec.
- Caracterización de Vesículas Extracelulares por Citometría de Flujo

Instrumentación

- **Citómetro analizador FACS Canto II (BD Biosciences):** equipo que permite el análisis de hasta ocho fluorescencias distintas, gracias a la utilización de sus tres líneas de láser (azul, 488 nm; rojo, 633 nm y violeta, 405 nm) y de sus ocho detectores independientes. Este equipo permite el **análisis multiparamétrico de poblaciones celulares complejas**.
- **Citómetro separador FACS Aria III (BD Biosciences):** este equipo permite la detección de hasta nueve fluorescencias distintas, gracias a su configuración actual con tres líneas de láser (azul, 488 nm; rojo, 633 nm y violeta, 405 nm), y tiene capacidad para detectar hasta 11 parámetros distintos. Su característica más importante es que permite la **separación física a alta velocidad de poblaciones celulares**, en base a la expresión diferencial de uno o varios parámetros analizables por técnicas de citometría de flujo, para su posterior utilización en ensayos bioquímicos, moleculares o incluso, de diferenciación celular.

Dispone de una unidad ACDU (AutomatedCellDepositionUnit), que permite la recolección de las células separadas en placas multipocillo o portaobjetos.

Dispone de una unidad de control de temperatura de los soportes de recogida, tanto para tubos como para placas. Rango de temperatura: de 4 °C a 42 °C.

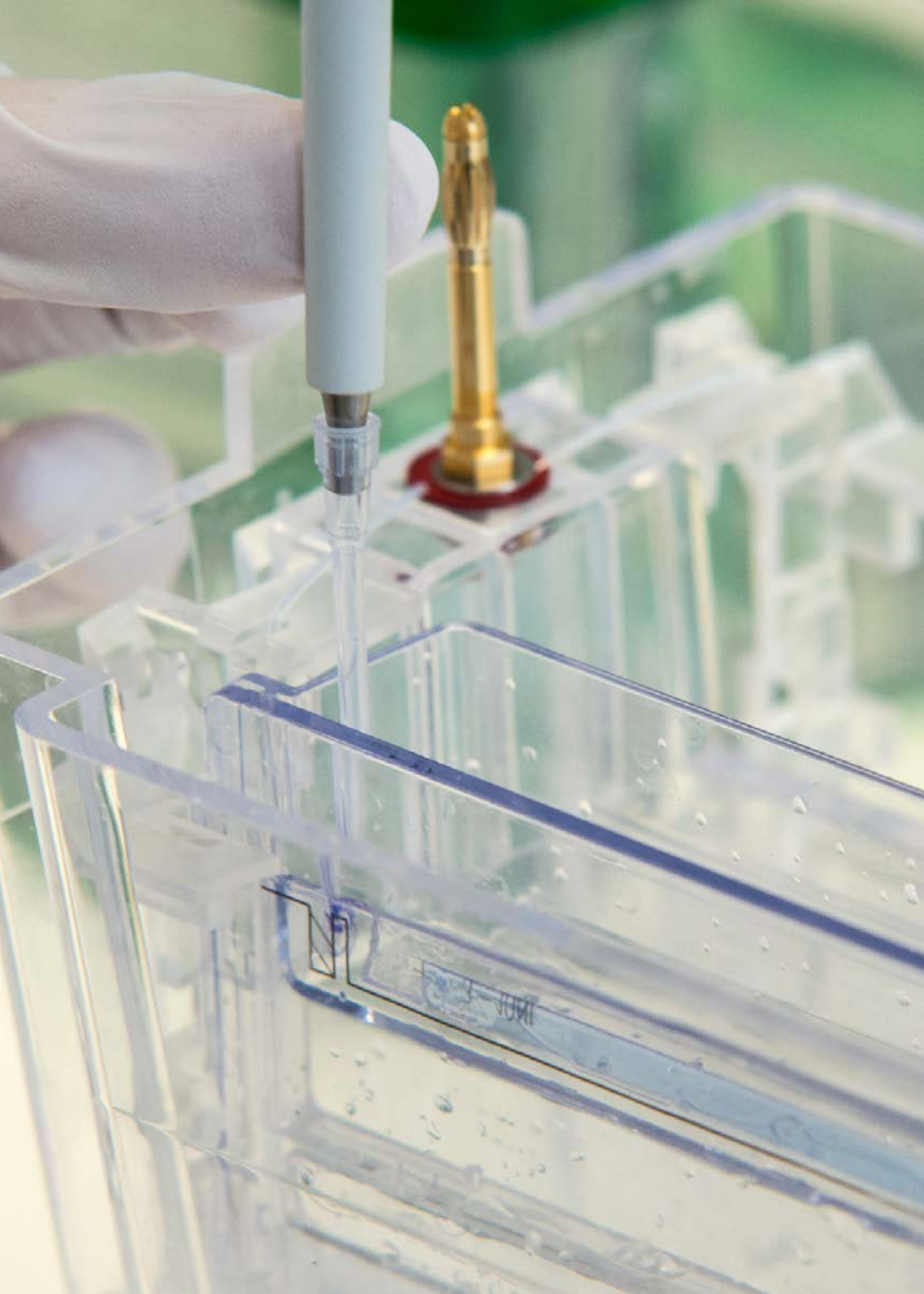
- **Citómetro analizador CytoFLEX S (BeckmanCoulter):** equipo que permite el análisis de hasta trece fluorescencias de forma simultánea, gracias a la utilización

de sus cuatro líneas de láser (azul, 488 nm; rojo, 633 nm; amarillo/verde, 561 nm y violeta, 405 nm) y de sus trece detectores independientes configurables. Este equipo permite el **análisis multiparamétrico de poblaciones celulares complejas**. Además, la resolución de este equipo permite distinguir partículas y **vesículas extracelulares entre 80-200 nm** de tamaño gracias a la medición de señales en SSC por el láser violeta. También permite contaje absoluto volumétrico.

- **Sistema de separación magnética MACS (MiltenyiBiotec):** Sistema para separar células marcadas con anticuerpos acoplados a microesferas magnéticas en columnas. 2 tipos de imanes: OctoMACS, para columnas MS (hasta 108 células totales) y MidiMACS, para columnas LS (hasta 109 células totales).

Autoservicio/Otros Servicios

- Asesorar a los investigadores sobre las distintas técnicas de citometría de flujo, así como optimizar de forma personalizada, el aislamiento de poblaciones celulares de distinta procedencia.
- Proporcionar apoyo científico y técnico, mediante la colaboración con los investigadores en el diseño experimental y en la interpretación de los resultados, así como en la preparación de los mismos para su publicación.
- Desarrollar y optimizar nuevas aplicaciones de citometría de flujo en el campo de la Neurociencia, mediante la incorporación de nuevas técnicas y reactivos.
- Realizar aislamientos celulares por cellsorting (purificación o enriquecimiento), a partir de muestras de distinta procedencia: tejido nervioso, células de tipo neural en cultivo, células modificadas, sangre periférica de pacientes, otros tejidos, etc.
- Formar a los usuarios en técnicas de Citometría de Flujo, en la utilización del citómetro BD FACSCanto-II, así como en los distintos programas de análisis de datos.



SAI-Proteómica

Responsable: Gemma Barroso García.

Correo electrónico: unidadproteomica.hnp@sescam.jccm.es

Teléfono: 925 396 823

Principios de la técnica

La proteómica consiste en el análisis masivo de proteínas en mezclas complejas basado para su identificación en una potente técnica, la espectrometría de masas. Existen distintos tipos en función del objetivo del estudio:

- i) descriptiva, que consiste en la identificación de proteínas contenidas en una muestra,
- ii) de expresión, que analiza las diferencias entre dos condiciones experimentales distintas,
- iii) funcional, que identifica proteínas en una célula o tejido en respuesta a condiciones biológicas específicas, determinándose las interacciones/complejos proteína-proteína.

Principales campos de aplicación

- Determinación de perfiles de expresión proteica.
- Análisis cuantitativos.
- Caracterización de modificaciones postraduccionales de las proteínas.
- Estudios de interacciones entre proteínas.
- Descubrimiento de biomarcadores de enfermedades.
- Investigación y desarrollo para la industria farmacéutica.

Tipos de ensayo

- Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)
- Electroforesis 2D (2-DE)

- Electroforesis 2D diferencial cuantitativa (2D-DIGE)
- Determinación de masa molecular.
- Estudios de fragmentación por ión.
- Identificación y caracterización de proteínas por MALDI.
- Identificación y caracterización de proteínas por LC-MS/MS.
- Análisis Cuantitativos:
 - SWATH (Data Independent Acquisition, estrategia libre de marcaje)
 - SRM/MRM (Selected Reaction Monitoring/Multiple Reaction Monitoring)

Instrumentación

• Espectrometría de masas

• TripleTOF 6600 plus (Sciex).

Cromatógrafo de líquidos ekspert nanoLC245 (Eksigent) con posibilidad de trabajo a flujos nL/min y μ L/min, acoplado a espectrómetro de masas híbrido cuadrupolo-tiempo de vuelo (QTOF).

Intervalo de masas: En TOF 40kDa, en Ion Precursor 5-2250 m/z

Fuente de ionización: Electrospray (ESI)

Resolución: En MS a masas altas 40.000 (FWHM), MS/MS 30.000 (FWHM)

Exactitud: 0.5ppm-2 ppm.

Ensayos: Identificación y caracterización de proteínas por LC-MS/MS, SWATH y MRMHR.

• 4000 QTrap (Sciex).

Cromatógrafo de líquidos Ultimate 3000 acoplado a espectrómetro de masas híbrido triple cuadrupolo-trampa lineal de iones.

Intervalo de masas: 5-2800 m/z como QQQ 70-2800 m/z como Trampa Lineal

Fuente de ionización: Electrospray (ESI) para flujos nano.

Resolución: 0.1-0.8 uma

Exactitud: 0.05-0.1 Da

Ensayos: Determinación de masas moleculares, estudios de fragmentación y análisis cuantitativos SRM/MRM

• 4800 Plus MALDI TOF/TOF (Sciex)

Espectrómetro de masas de tiempo de vuelo.

Intervalo de masas: hasta 150.000 Da

Fuente de ionización: Desorción/Ionización por Láser Asistida por Matriz (MALDI).

Resolución: En MS >17.000 (FWHM), MS/MS >3.000 (FWHM)

Exactitud: 10 ppm - 50 ppm.

Ensayos: Identificación y caracterización de proteínas por LC-MS/MS, SWATH y MRMHR.

• Electroforesis y Análisis de imagen 2D-gel.

• Sistemas de Isoelectroenfoco.

Dos equipos de isoelectroenfoco termostatizados para la separación de proteínas según su punto isoeléctrico utilizando tiras de gradiente de pH inmovilizado (IPG) de varios tamaños, con posibilidad de rehidratar de forma activa y carga de la muestra en "cup-loading".

- Ettan IPGphor 3 (GE Healthcare)

- PROTEAN i12 IEF Cell (BioRad)

• Sistema de Electroforesis.

Los sistemas de electroforesis con los que se cuenta están basados en la separación de proteínas a través de una matriz porosa (electroforesis en gel) según su peso molecular al aplicarles un campo eléctrico.

- Ettan Dalt Six (GE Healthcare)

- Hoefer SE 600 (GE Healthcare)

- Mini-PROTEAN 3 Dodeca Cell

- Mini-PROTEAN Tetra Cell (BioRad)

- Criterion™ Cell (BioRad)

• Sistema de Imagen.

- ImageScanner III (GE Healthcare). Es una versión modificada del escáner Epson Expression 10000XL, se usa para adquirir imágenes de geles y transferencias de electroforesis bidimensionales (2-D).

- Typhoon™ TRIO (GE Healthcare). Con cinco modos de escaneo produce imágenes digitales de muestras radiactivas, fluorescentes o quimioluminiscentes. Typhoon están completamente optimizado como parte del sistema Ettan DIGE y se integran perfectamente con el software de análisis diferencial DeCyder™.

• Otro equipamiento

• Experion. (BioRad)

La estación de electroforesis automatizada Experion realiza todos los pasos de la electroforesis de ácidos nucleicos y proteínas en gel en una unidad compacta.

• EXQuest Spot Cutter: (BioRad).

Sistema para el recorte automatizado de bandas o "spots" procedentes de geles. Opciones de escaneo en UV y Visible.

• Äkta Prime plus (GE Healthcare).

Sistema de cromatografía en fase líquida preparativa para la purificación de proteínas

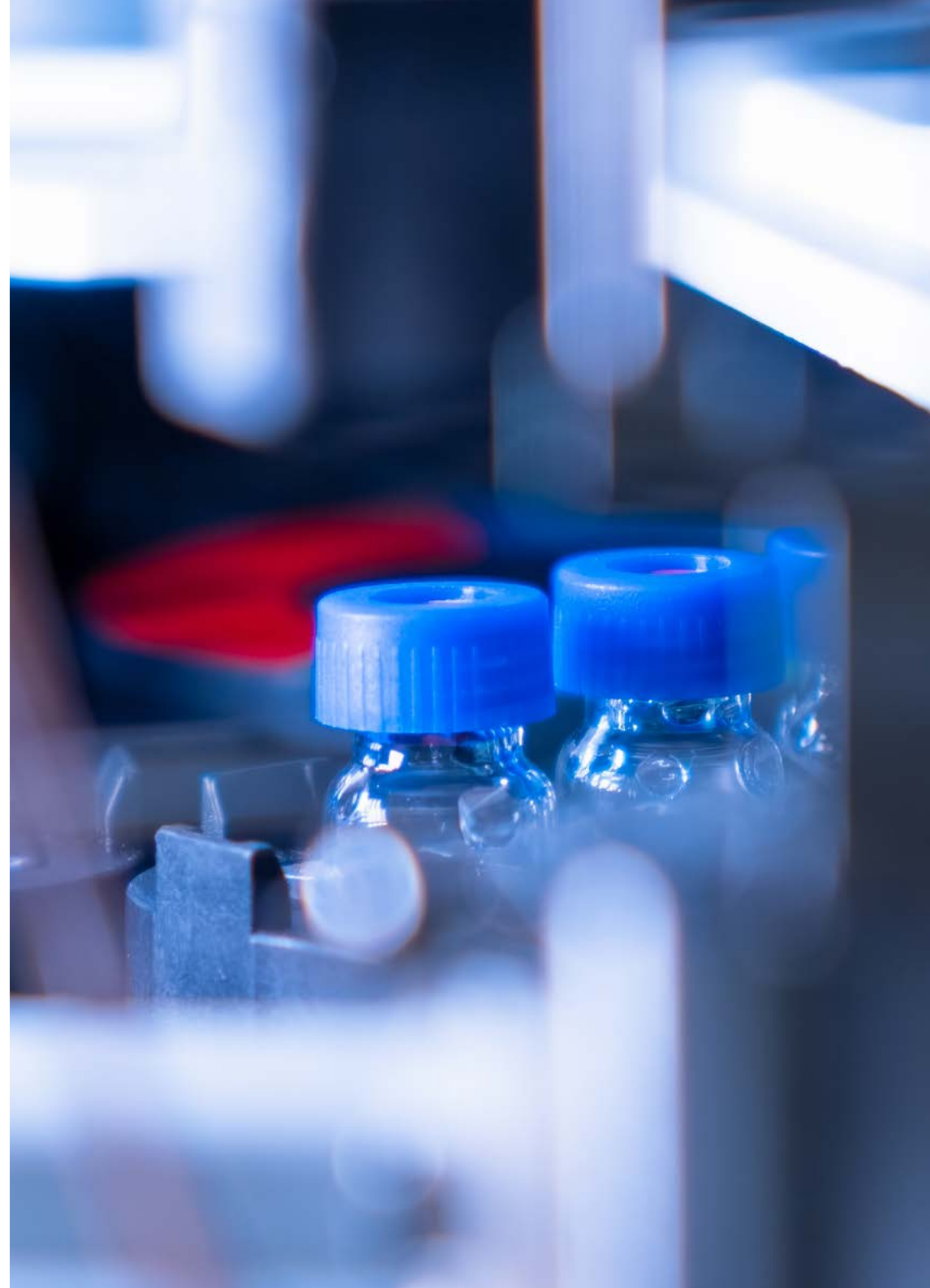
- **Software para análisis de datos.**

El SAI dispone de recursos informáticos para el procesado de los datos generados en los ensayos ofertados.

- DeCyder™ v7.0 (GE Healthcare) Software específico para el análisis de expresión diferencial de geles de proteínas marcadas con tecnología - DIGE (GE Healthcare). Incluye módulos de análisis de diferencia en gel (DIA) y análisis de variación biológica (BVA).
- ProteinPilot™ v5.0.2 (Sciex). Programa de búsqueda automatizada de proteínas que incluye los motores de búsqueda MASCOT V2.5. y el Paragon (Sciex).
- PeakView v2.0 (Sciex) nos permite visualizar y revisar los datos de LCMS y LCMSMS.
- MarkerView v1.3.1 (Sciex) software de análisis estadístico a partir de datos de espectrometría de masas.
- Skyline para la generación de métodos de proteómica dirigida (MRM) y su posterior análisis.

Autoservicio/Otros Servicios

- Separaciones por punto isoeléctrico (IEF).
- Geles SDS-PAGE de 16 y 24 cm.
- La estación de electroforesis automatizada Experion realiza todos los pasos de la electroforesis de ácidos nucleicos y proteínas en gel en una unidad compacta.
- Sistema de cromatografía en fase líquida preparativa para la purificación de proteínas.
- DeCyder™: Software de análisis de imágenes para expresión diferencial.
- Asesorar a los investigadores sobre las distintas estrategias en proteómica, así como optimizar protocolos dependiendo del tipo de muestra a analizar.
- Proporcionar apoyo científico y técnico, mediante la colaboración con los investigadores en el diseño experimental y en la interpretación de los resultados, así como en la preparación de los mismos para su publicación.
- Desarrollar y optimizar nuevas aplicaciones de proteómica en el campo de la Neurociencia, mediante la incorporación de nuevas técnicas y reactivos.
- Formar a los usuarios en técnicas de proteómica, así como en los distintos programas de análisis de datos.





Otras Unidades Técnicas

Unidad de Vesículas Extracelulares (UVEx).

Contacto: UVEx.hnp@sescam.jccm.es.

- Aislamiento de Vesículas Extracelulares de diferentes fluidos.
- Caracterización de Vesículas Extracelulares por Citometría de Flujo.
- Caracterización del cargo proteico por Espectrometría de Masas.

Unidad de Cultivos Celulares.

Contacto: sai.hnp@sescam.jccm.es.

- Actualmente la unidad cuenta con asesoramiento en la generación y mantenimiento de cultivos primarios y/o líneas celulares establecidas.
- Preparación de medios de cultivo y tampones bajo condiciones de esterilidad.
- Testado de micoplasma en líneas celulares.
- Criopreservación de líneas celulares, llenado y mantenimiento de bidones de nitrógeno líquido.

Unidad de Ingeniería y Evaluación Motora (UIEM).

Contacto: enriquep@sescam.jccm.es. Teléfono: 925247700. Ext.: 47533.

Presta apoyo de ingeniería a los diferentes grupos de la Unidad de Investigación del Hospital Nacional de Paraplégicos en las siguientes líneas de trabajo:

- Desarrollo de prototipos mecatrónicos e instrumentación.
- Desarrollo de software en distintos lenguajes de programación: Python, MATLAB, LabVIEW.
- Explotación de datos.
- Evaluación cinemática de la locomoción de pequeños animales.
- Funcionamiento de diferentes equipos de evaluación de la motricidad y el comportamiento animal: CATWALK, VERSAMAX, Hand-grip, Von Frei automático, Hargreaves.
- Gestión del equipamiento común de la Unidad de Investigación.

WEB:



BLOG:



Hospital Nacional de Paraplégicos

Edificio Investigación i1 | Finca La Peraleda s/n - 45071 Toledo

e-mail: sai.hnp@sescam.jccm.es



Unión Europea

Fondo Europeo
de Desarrollo Regional
"Una manera de hacer Europa"



Castilla-La Mancha