

Investiga la vacuna del VIH



**Taller d'experimentació
PROTOCOL**

IrsiCaixa
Institut de Recerca de la Sida

**U
B**
Parc Científic
de Barcelona
B: KC



Obra Social
"la Caixa"

**Xplore
Health**

www.xplorehealth.eu



➡ Abstract

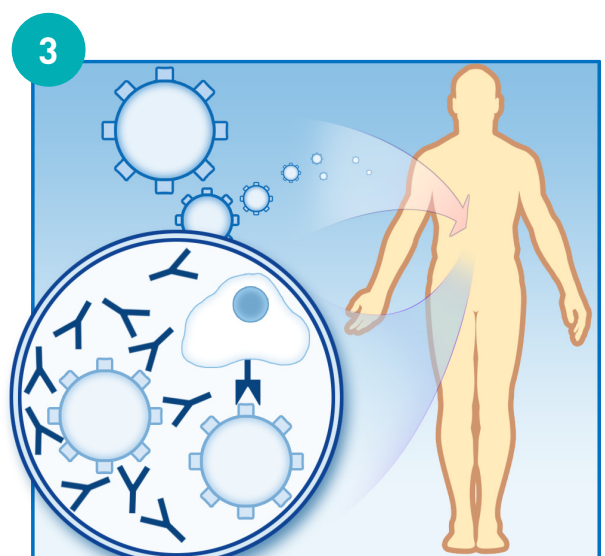
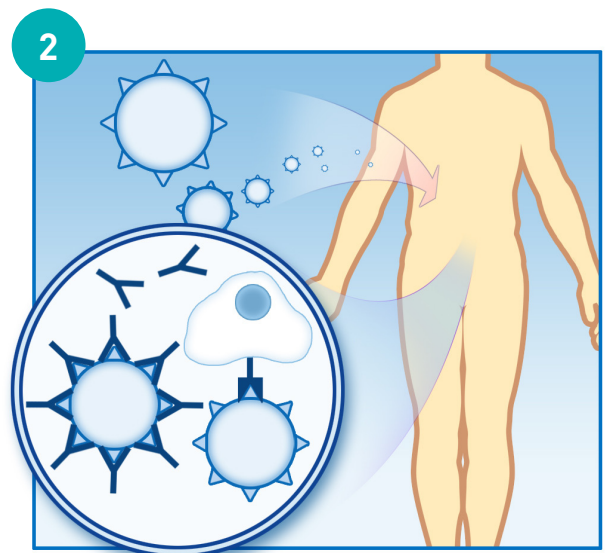
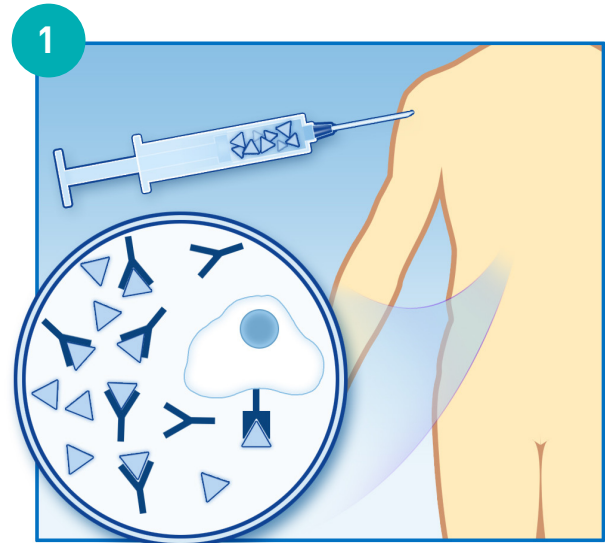
L'Institut de Recerca de la Sida IrsiCaixa està investigant una vacuna per protegir les persones contra el virus de la sida (VIH) i actualment ja ha identificat un candidat a vacuna, que es troba en procés de desenvolupament. Una de les principals dificultats a l'hora de desenvolupar la vacuna és superar la immensa variabilitat del virus circulant a les diferents regions del món. En aquest taller investigaràs si la vacuna contra el VIH desenvolupada per IrsiCaixa podria ser eficaç per protegir la població de diferents continents.

➡ Introducció

Més de 33 milions de persones a tot el món estan infectades pel virus causant de la sida, o VIH, i cada minut 6 persones s'infecten de nou. Actualment, ja disposem de medicaments per prolongar i millorar la qualitat de vida de les persones infectades, però no existeix una cura definitiva ni tampoc no disposem d'una vacuna.

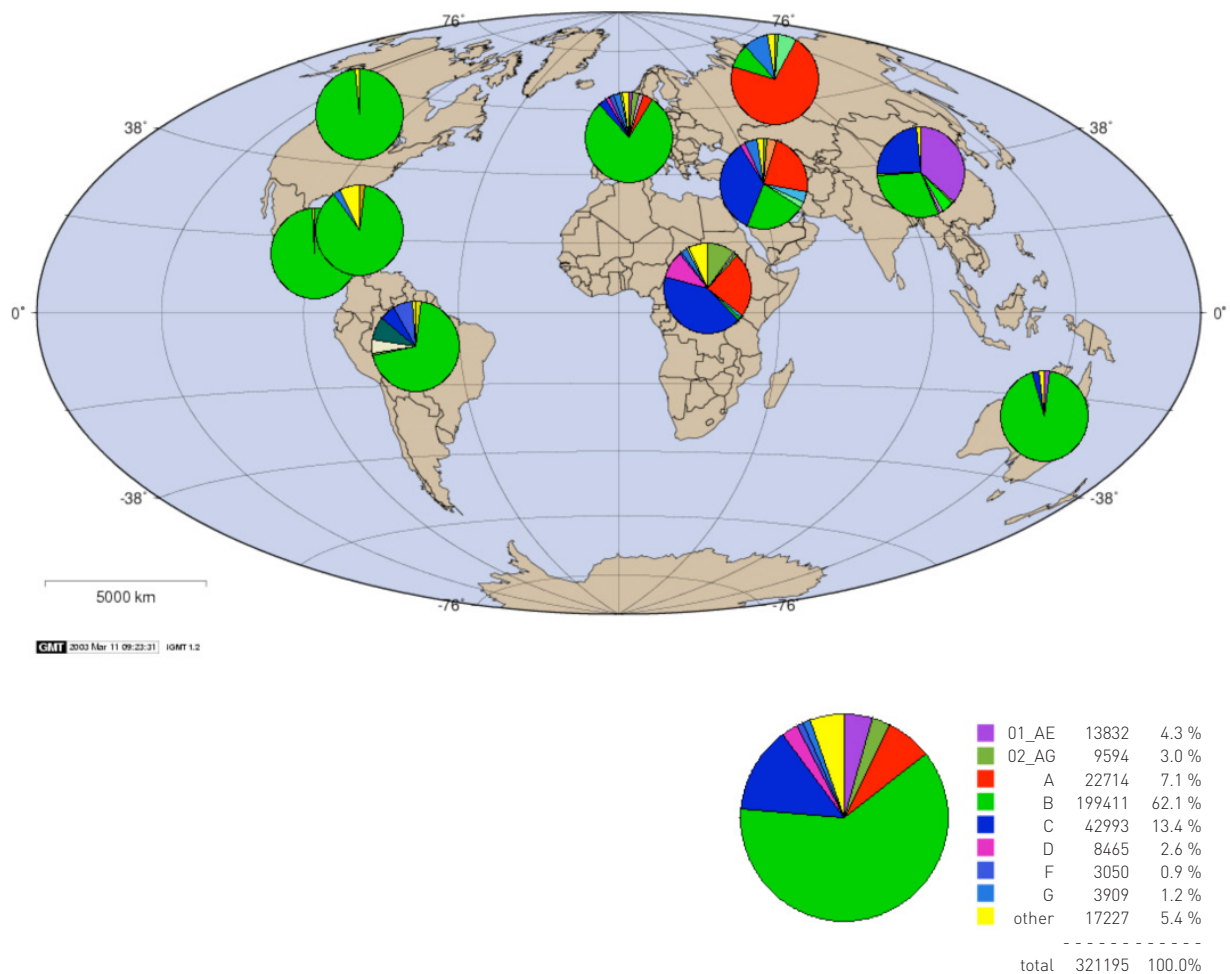
Fa més de 15 anys que l'Institut de Recerca de la Sida IrsiCaixa investiga per desenvolupar una vacuna i avança en la millora dels tractaments existents. Mentrestant, la millor eina per combatre la pandèmia és la prevenció.

Una vacuna és una substància que “ensenya” el nostre sistema immunitari a reconèixer i defensar-se contra virus o bacteris que causen malalties. Quan ens vacunem, el nostre sistema immunitari reconeix els agents de la vacuna com a estranys i desencadena una resposta contra ells. D’aquesta manera, quan l’organisme ens infecta, el nostre sistema immunitari ja està preparat per respondre.



1. La proteïna candidata a vacuna estimula el sistema immunitari a produir anticossos contra ella
2. Si un dia la persona vacunada s’infecta, ja té anticossos per lluitar contra el VIH
3. Però, si un dia la persona vacunada s’infecta amb un VIH que té la proteïna diferent, els anticossos generats per la vacuna no li servirien per lluitar contra la infecció

La dificultat per desenvolupar la vacuna per al VIH rau en trobar una vacuna que sigui capaç d'activar el sistema immunitari perquè elimini totalment la infecció causada pels milions de diferents tipus de VIH que existeixen arreu del món.



Distribució de les diferents variants de VIH-1 a tot el món. (Los Alamos HIV sequence Database, www.hiv.lanl.gov)

Com pots participar tu en la recerca de la vacuna per al VIH?

En aquest taller podràs investigar amb una proteïna que forma part del VIH i que IrsiCaixa ha identificat que podria formar part d'una vacuna per protegir les persones contra aquest virus, ja que s'ha demostrat in vitro que estimula la resposta immunitària.

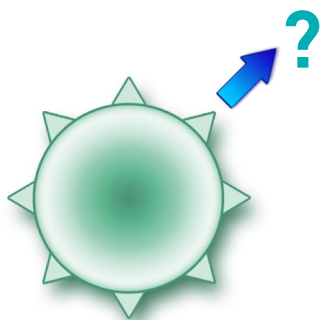
Actualment IrsiCaixa està duent a terme estudis in vitro per avaluar la seva eficàcia, i en cas que tot vagi bé, posteriorment se seguiran fases de recerca més avançades fins a dur a terme proves amb pacients.

L'objectiu del taller serà esbrinar si el candidat a vacuna d'IrsiCaixa serà eficaç per protegir les persones contra la immensa variabilitat de VIHs que circulen a les diferents regions del planeta. Caldrà desenvolupar diferents vacunes per a diferents zones del planeta?

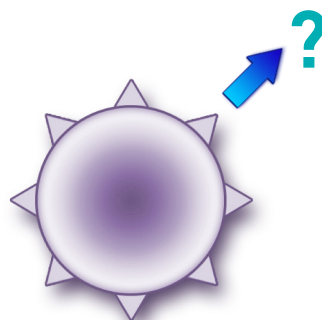
Per investigar-ho, hauràs d'analitzar si aquesta proteïna està present en variants del VIH provinents d'Àfrica, d'Àsia i d'Europa.

Si hi està present, la vacuna podria ser efectiva per prevenir la infecció d'aquestes variants de VIH ja que estimularia una resposta immunitària contra aquestes. Per tant, podria ser eficaç per protegir la població d'aquests continents.

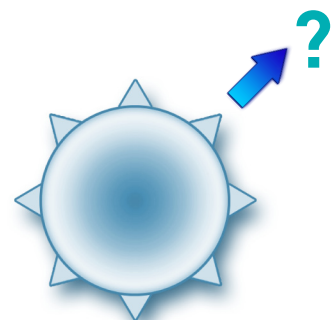
Però si alguna de les variants no té present la proteïna candidata, aleshores la vacuna no seria efectiva contra aquesta variant de VIH, i caldria modificar-la.



Virus africà



Virus asiàtic



Virus europeu



Objectius

- Participar en el procés de desenvolupament de la vacuna de la sida d'IrsiCaixa, seguint les etapes de la metodologia científica.
- Utilitzar les tècniques de laboratori que s'utilitzen en aquest camp de recerca, com ara la separació de fragments de DNA mitjançant electroforesis o la segmentació de DNA utilitzant enzims de restricció.
- Investigar i familiaritzar-se sobre la immensa variabilitat del virus de la sida
- Comprovar si la proteïna que IrsiCaixa ha identificat com a possible candidat a vacuna, podria ser útil per estimular el sistema immunitari de persones exposades a les variants majoritàries del VIH de diferents continents: Àfrica, Àsia i Europa.

Hipòtesis

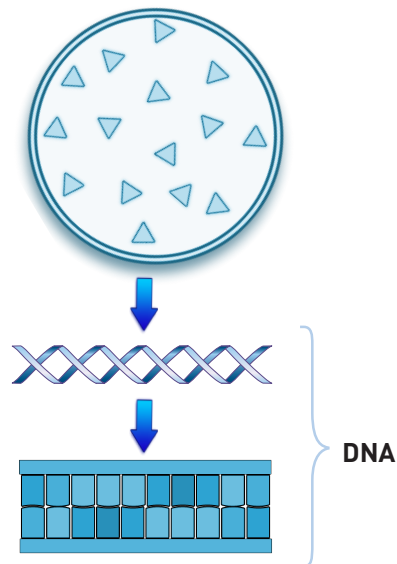
La proteïna candidata a formar part d'una vacuna identificada per IrsiCaixa, no es veu modificada en la gran majoria de variants de VIH existents arreu del planeta. Per tant, una vacuna que contingui aquesta proteïna hauria de ser igualment efectiva per combatre la majoria de les variants de VIH existents.



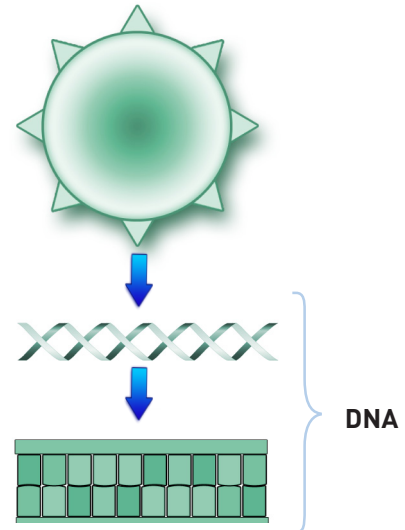
Metodologia

Treballarem amb mostres de DNA de les tres variants de VIH que es troben en major proporció a tres continents: Àfrica, Àsia i Europa.

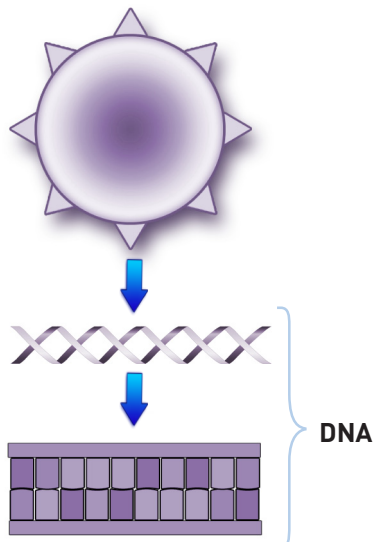
També disposarem d'una mostra de DNA que té codificada la informació per produir la proteïna candidata a vacuna d'IrsiCaixa. Amb aquestes mostres investigarem si les diferents variants del VIH tenen present la seqüència de DNA candidata.



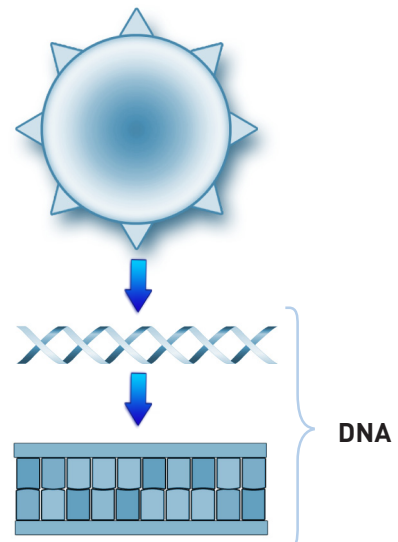
Proteïna candidata



Variant majoritària de VIH europeu



Variant majoritària de VIH africà



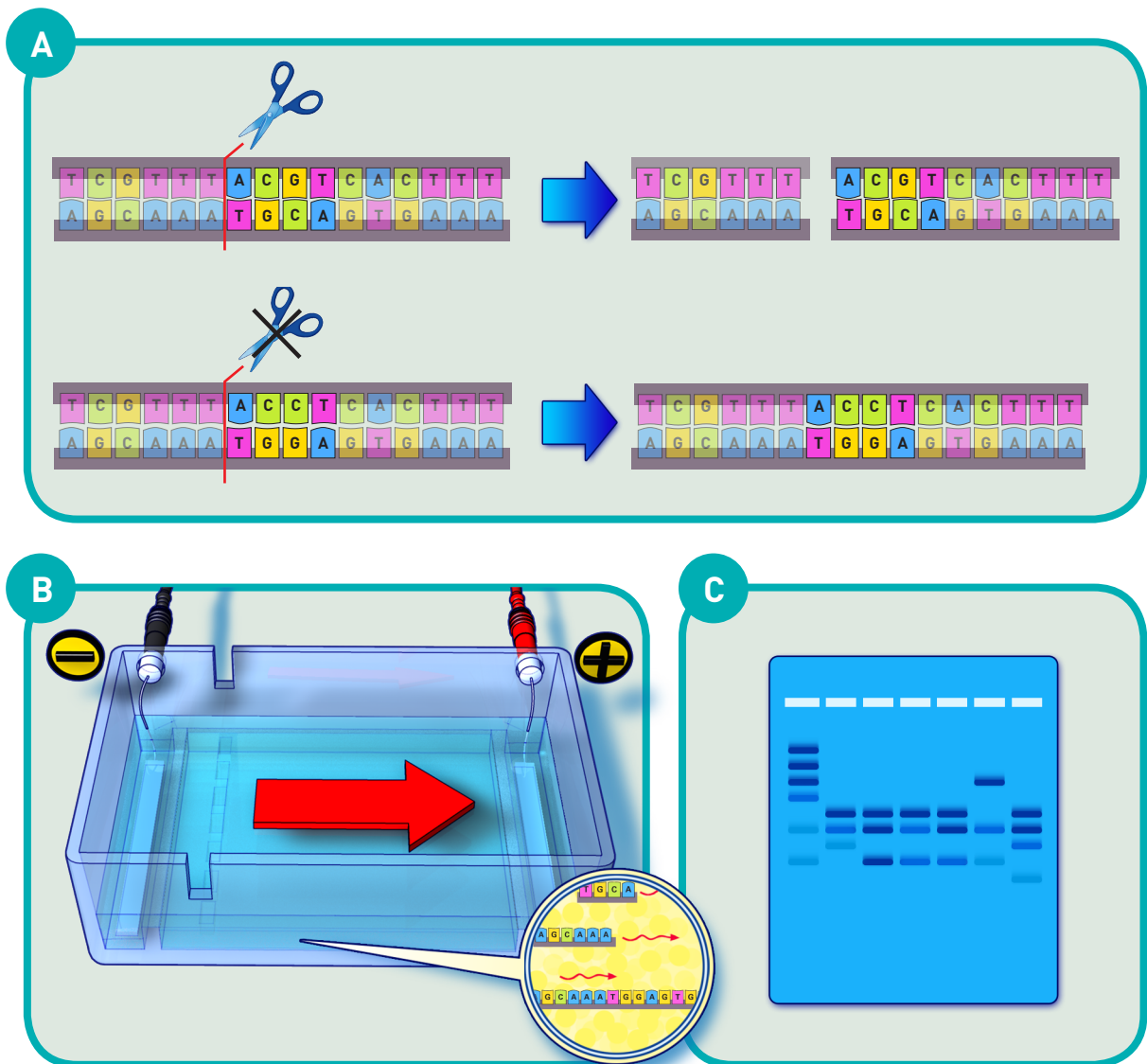
Variant majoritària de VIH asiàtic

Per dur a terme aquesta recerca haurem de desenvolupar les següents tasques:

(A) Tallem les cadenes de DNA dels virus dels tres continents: Per fer-ho utilitzarem enzims de restricció, que són proteïnes que els investigadors saben que tenen la capacitat de tallar DNA en zones específiques. L'enzim que utilitzarem talla específicament el gen responsable de sintetitzar la proteïna candidata, però no talla si aquesta presenta alguna variació en la regió de DNA d'estudi. Per tant les mostres de DNA només es tallaran si tenen aquest gen conservat.

(B) Separem els fragments de DNA: Amb l'ajut d'una tècnica anomenada electroforesis, separarem els fragments de DNA resultants després de ser digerits pels enzims.

(C) Visualitzem els fragments de DNA: Visualitzarem quines mostres de DNA han estat tallades, i per tant, quines variants tenen la proteïna candidata.





Resultats i conclusions

Compararem les seqüències genètiques de les diferents variants de VIH, analitzant l'efecte de l'enzim de restricció, i així identificarem les diferències entre els seus DNAs. Amb aquesta informació podrem reflexionar sobre la immensa variabilitat del VIH.

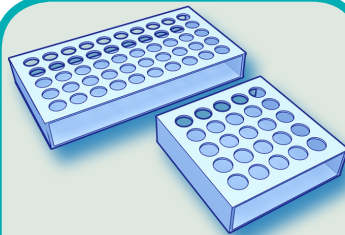
Amb els resultats obtinguts podrem concloure si la proteïna candidata d'IrsiCaixa podria ser d'utilitat per protegir la població dels diferents continents, o si caldrà desenvolupar diferents vacunes, cadascuna adaptada a la seqüència del virus present a cada àrea geogràfica.

Instruments i materials necessaris

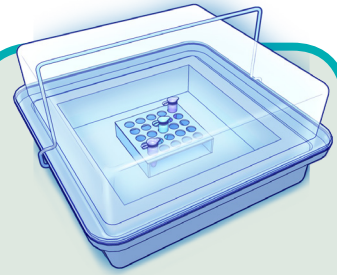
Instruments i material de laboratori



Pipetes de 10 i 20µl



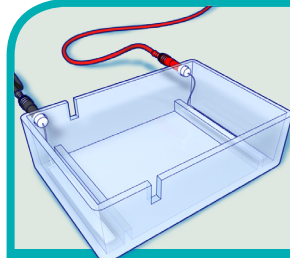
Gradetes



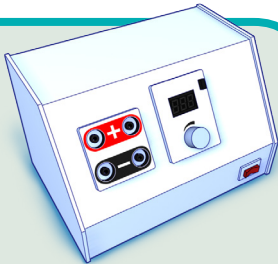
Refredador



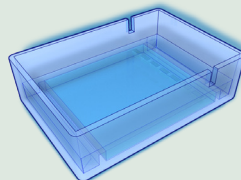
Bany d'aigua i suport per als tubs



Cubeta electroforesis



Font d'alimentació



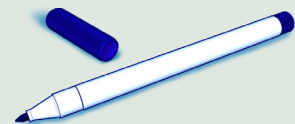
Gel d'agarosa



Cronòmetre



3 contenidors (per tenyir i netejar el gel)

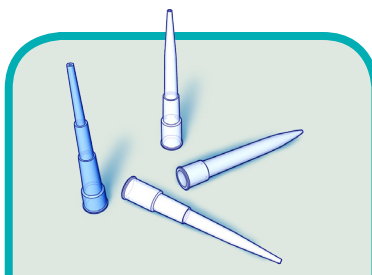


Retolador de vidre

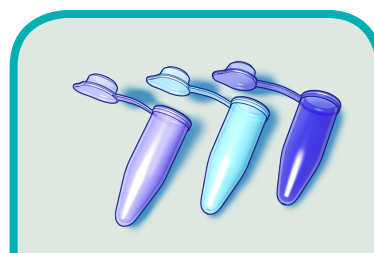
Material fungible



Guants i bates

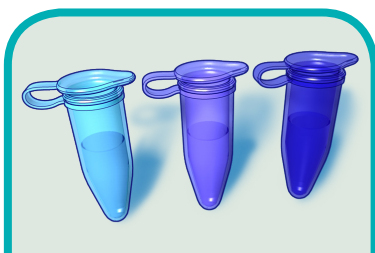


Puntes de pipeta



Tubs de 1,5 ml i/o 0,5 ml

Reactius i dissolvents*



DNA de virus
de diferents orígens



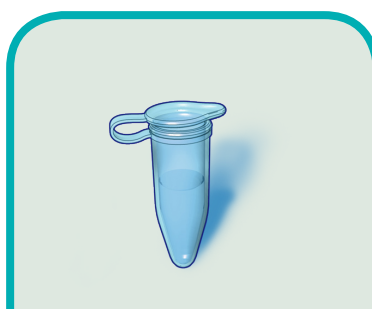
Enzim de restricció
NheI + tampó (1)



Marcador de pes molecular
(2)



Tampó TAE
500ml de TAE 0.5x (3)



Tampó de càrrega
(4)



Líquid per tenyir el DNA
(Stain Fast 100x)



Aigua destil·lada: 3 ampolles de vidre de 500ml
i un tub de 1.5 ml.

- (1) El tampó és per obtenir medi adequat per a l'actuació de l'enzim.
- (2) El marcador porta una etiqueta on s'indica: mides dels diferents fragments d'entre 100 i 3.000 parell de bases.
- (3) Per mantenir el pH i també conté sals per facilitar el pas del corrent elèctric (a concentració 0.5x per omplir la cubeta).
- (4) Per donar color i densitat a les mostres i facilitar així la seva càrrega.

* Si voleu fer aquest experiment al vostre centre educatiu o museu, contacteu amb divulgacio@irsicaixa.es per a que us facilitin els reactius necessaris.



Procediment

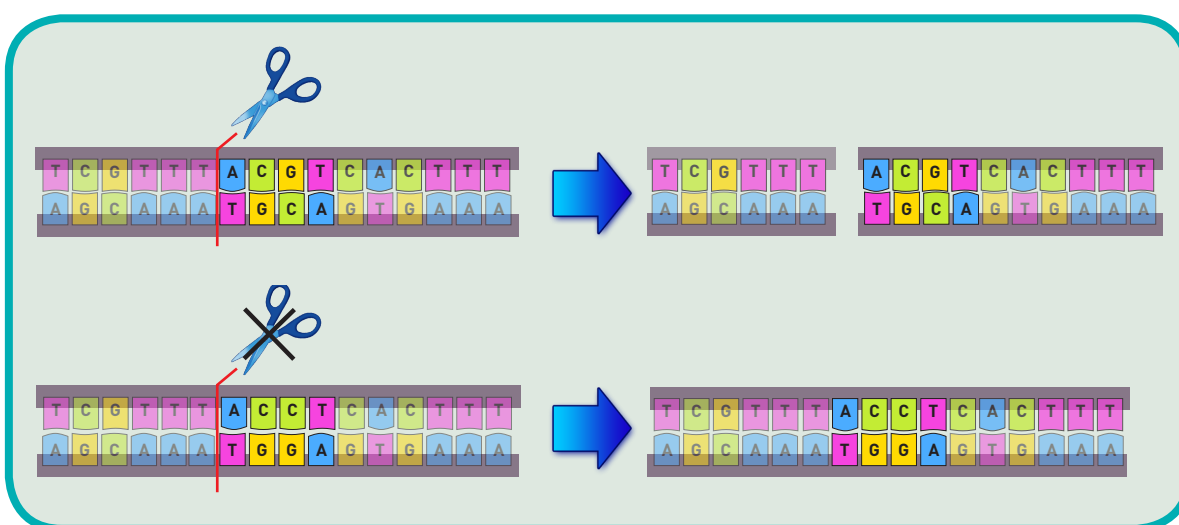
A

“Tallem” les cadenes de DNA dels virus dels tres continents+

INTRODUCCIÓ

Els DNAs de les tres variants de VIH els tallarem utilitzant els anomenats enzims de restricció, que són proteïnes que els investigadors saben que tenen la capacitat de tallar DNA en

zones específiques. L'enzim que utilitzarem talla específicament el gen responsable de sintetitzar la proteïna candidata, però no talla si aquest presenta alguna variació en la regió de DNA d'estudi. Per tant les mostres de DNA només es tallaran si tenen aquest gen conservat.



PROCEDIMENT A

1

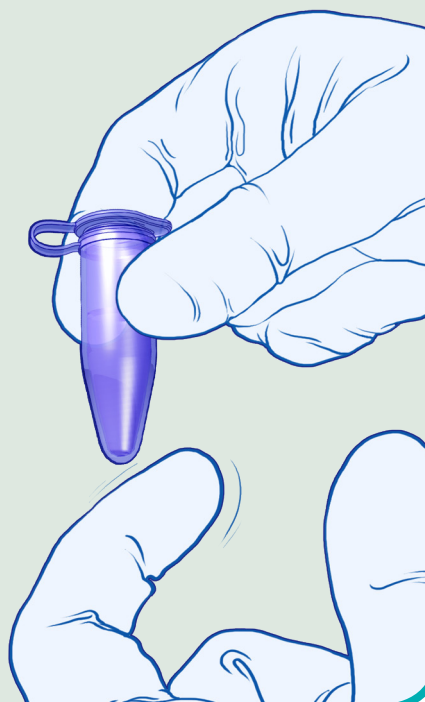


Preparem amb la pipeta els components de la reacció de digestió en quatre tubs de 1,5 ml degudament rotulats. Afegim a cada tub:

- Aigua destil·lada 16 μ l
- Tampó per optimitzar l'actuació de l'enzim de restricció (color verd) 3 μ l
- Enzim de restricció (en fred) 1 μ l
- Una de les quatre mostres de DNA (una de la proteïna candidata i 3 de cadascuna de les variants de VIH) 10 μ l

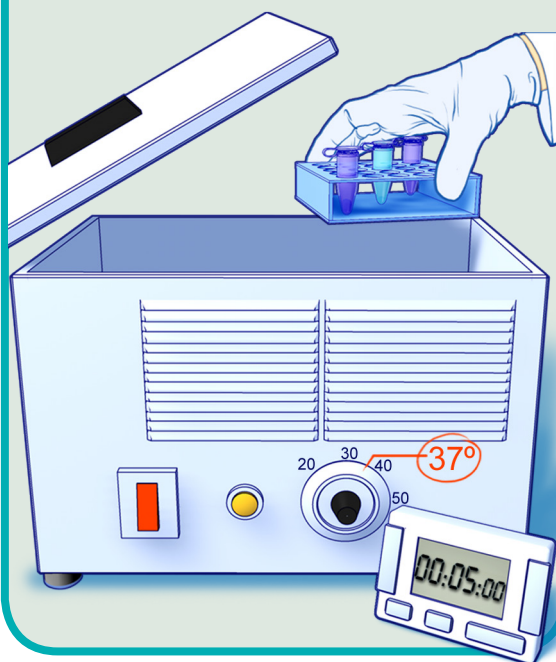
2

Tapem el tub i sacsegem suaument amb el dit



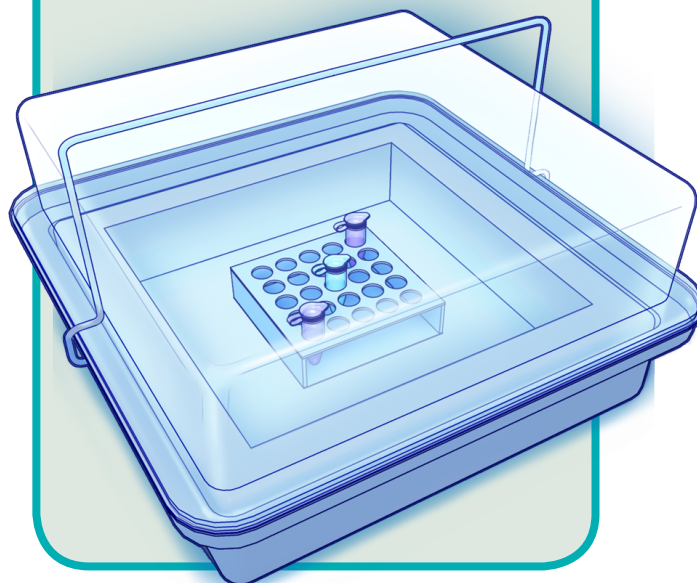
3

Incubem el tub a 37 °C durant 5 minuts per tal que l'enzim de restricció talli el DNA



4

Passats els 5 minuts col·loquem el tub al refredador per parar la reacció de digestió



B

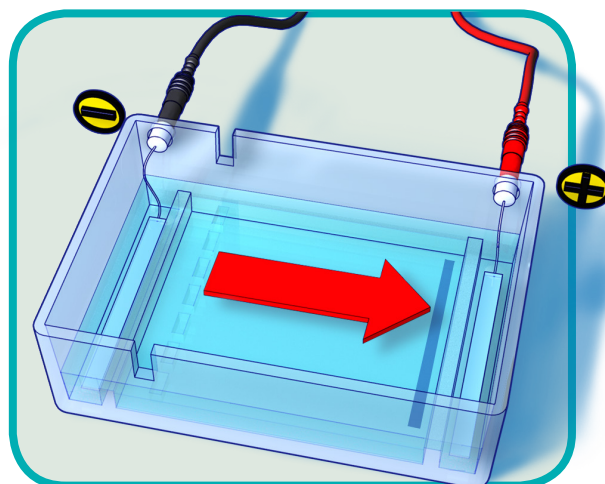
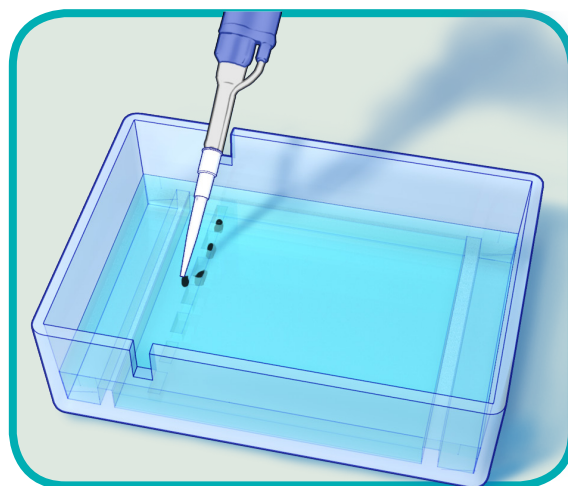
Separem els fragments de DNA tallats

INTRODUCCIÓ

Per separar els fragments de DNA utilitzarem una tècnica anomenada electroforesis, que és molt utilitzada al laboratori ja que ens permet separar els fragments de DNA segons la seva longitud.

Per fer-ho es col·loquen les mostres de DNA sobre un gel porós fet d'una gelatina que s'extreu d'algues marines. Per facilitar la col·locació de les mostres i poder visualitzar com es desplacen, s'afegeix un "tampó de càrrega" que els dóna densitat i color. També es carrega el gel amb un "marcador de DNA", que conté fragments de DNA de mides conegudes, per poder així deduir la longitud dels fragments de les mostres d'estudi.

El gel se sotmet a un corrent elèctric de manera que a un extrem hi queda concentrada la càrrega negativa i a l'altre la càrrega positiva. Com que els fragments de DNA de forma natural tenen càrrega negativa, quan els col·loquem a un extrem del gel aquests es desplacen atrets per la càrrega positiva. La distància que recorren els diversos fragments a través del gel és proporcional a la seva longitud, de manera que aquells fragments més petits podran avançar més que no pas els fragments més grans que tindran més dificultats per passar a través dels porus del gel.



PROCEDIMENT B

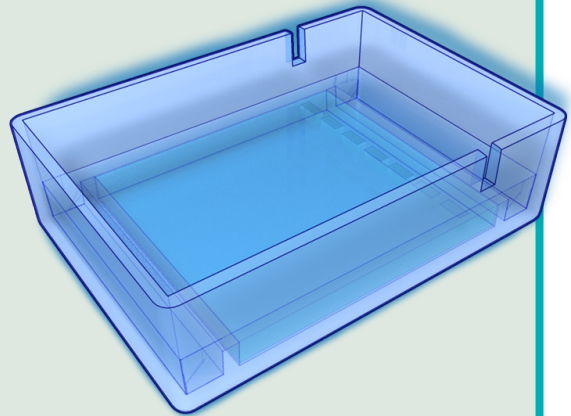
1



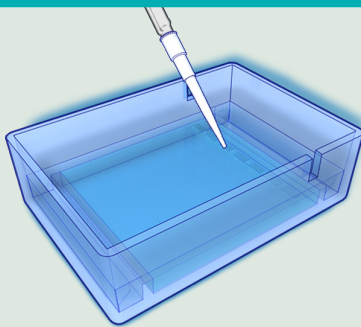
Preparem les mostres de DNA amb tampó de càrrega. A les mostres digerides amb l'enzim de restricció no caldrà afegir-hi tampó de càrrega, donat que quan hem afegit el tampó de l'enzim, aquest ja duia incorporat un tampó de càrrega de color verd. Agafem doncs 3 tubs de 0,5 ml i hi afegim amb la pipeta 2µl de tampó de càrrega de color verd i 20µl de la mostra original sense digerir. Aquestes mostres ens serviran de control.

2

Col·loquem el gel al centre de la cubeta d'electroforesis i amb els pouets a l'extrem negatiu. A continuació, omplim la cubeta amb la solució tampó TAE 0,5x, fent-la caure pels laterals per tal de no trencar el gel, fins cobrir-lo completament.



3

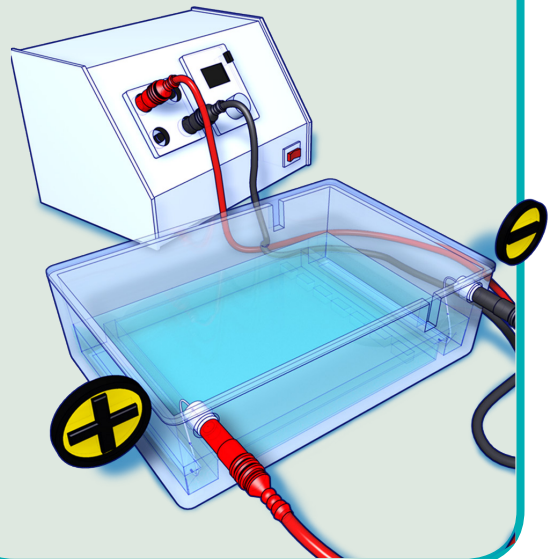


Carreguem les mostres als pouets amb la pipeta, en el següent ordre:

- el primer pou per al marcador de DNA (25µl)
- els tres següents per a les mostres de DNA de les variants no digerides (20µl)
- i els quatre següents per a les mostres digerides (primer el DNA del candidat i a continuació les mostres de les 3 variants de VIH) (25µl)

4

Tapem la cubeta i la connectem a la font a 130v i 200 mA durant aproximadament 20 minuts.



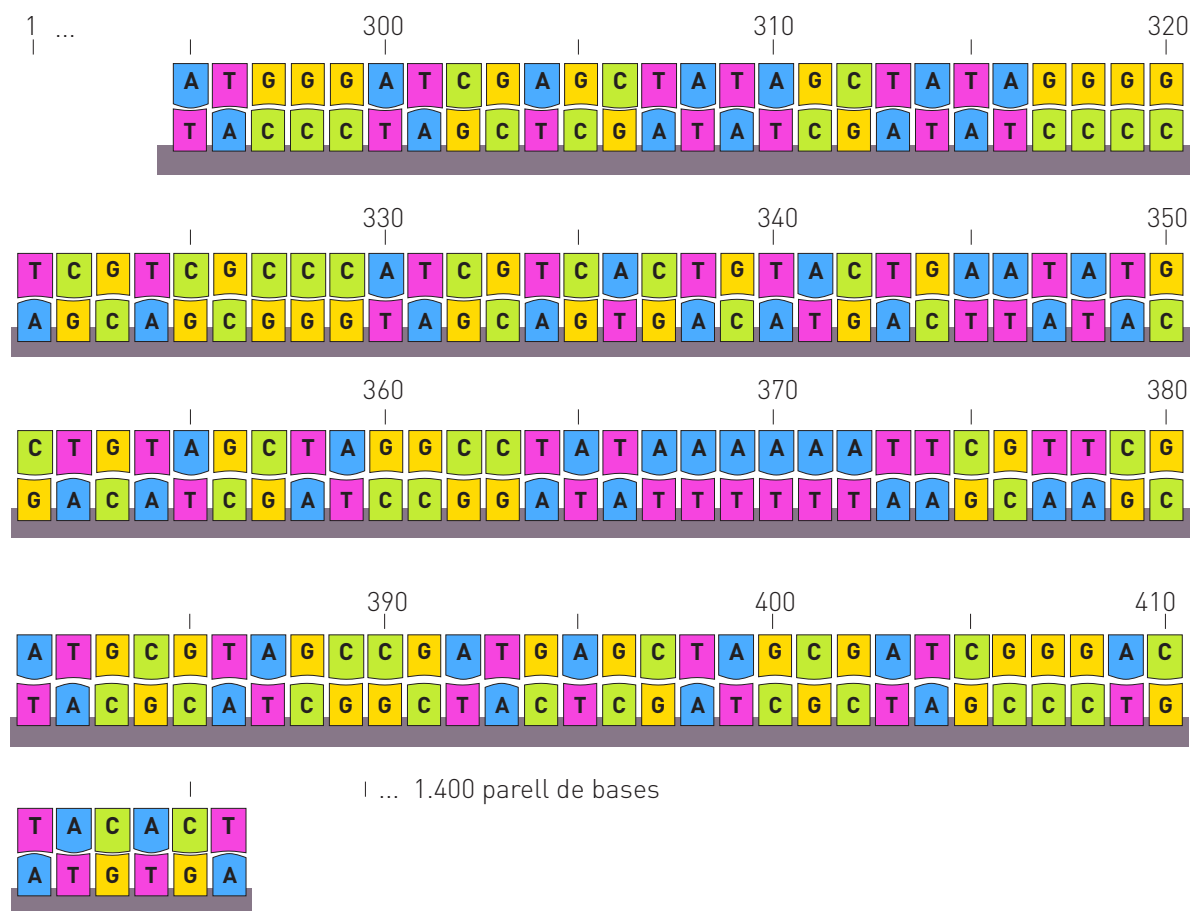


Mentre el gel corre, practica: mapa de restricció

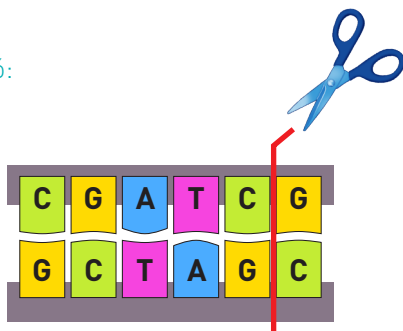
?

1. Identifica la/les seqüència/es diana de l'enzim de restricció NheI dins la seqüència completa del DNA de la proteïna candidata

Seqüència completa del DNA candidat a vacuna:



Seqüència diana de l'enzim de restricció:



?

2. Quants fragments de DNA obtindrem si l'enzim troba la seva diana i talla el DNA?
De quina mida?

?

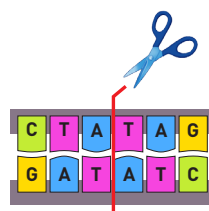
3. Quants fragments de DNA obtindrem si l'enzim NO troba la seva diana i NO talla el DNA?
De quina mida?

?

4. Com creus que el marcador de DNA t'ajudarà a identificar les mides dels fragments que obtindràs?

?

5. Identifica la/les seqüència/es diana de l'enzim de restricció EcoRV dins la seqüència completa del DNA de la proteïna candidata:



?

6. Quants fragments de DNA obtindríem si haguéssim utilitzat aquest altre enzim? De quina mida?

(En l'expriment hem utilitzat l'enzim NheI perquè la zona on talla és la que ens interessa estudiar donat que és la que és més efectiva a l'hora d'estimular el sistema immunitari)



Practica: observa com està corrent el gel d'electroforesis

?

7. Per què se separen els fragments? Com s'ho fa l'agarosa per separar els fragments?

?

8. Quina càrrega té el DNA? Què hagués passat si haguessis connectat els elèctrodes a l'inrevés?

?

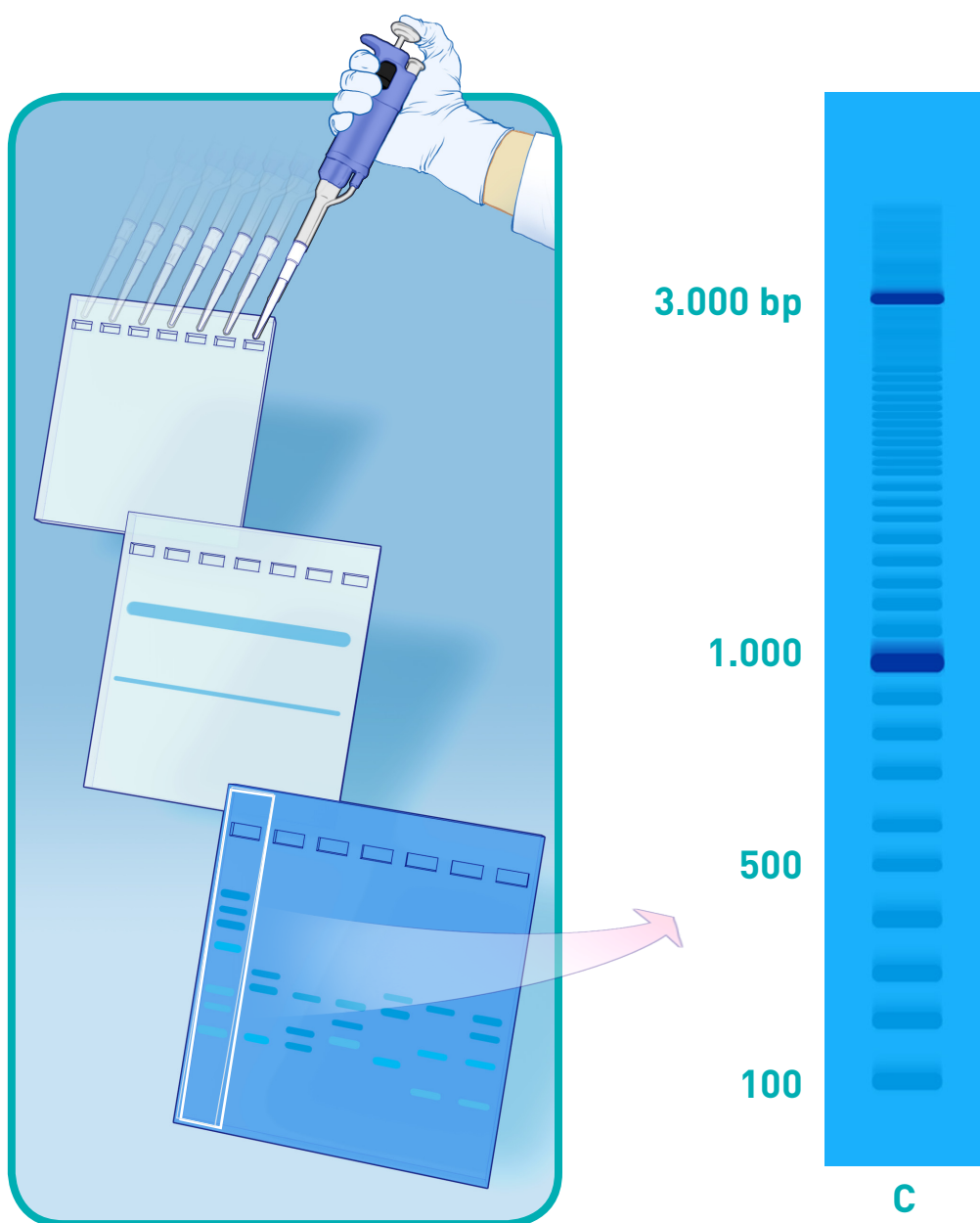
9. Què visualitzes? Per què has afegit el tampó de càrrega?

C

Visualitzem els fragments de DNA

INTRODUCCIÓ

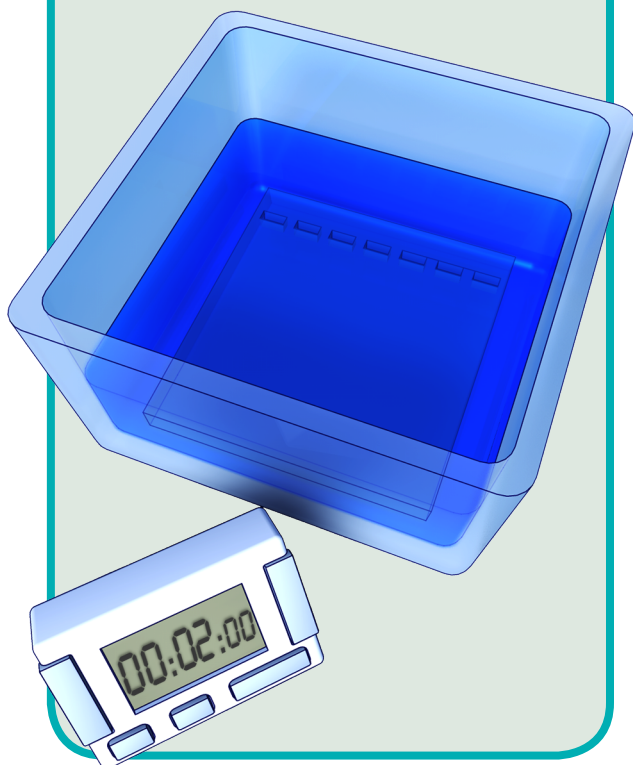
En aquesta etapa tenirem els fragments de DNA per poder-los visualitzar i observar així si han estat tallats. Només aquells que hagin estat tallats tenien el gen responsable de sintetitzar la proteïna candidata d'IrsiCaixa amb la seqüència original, és a dir, sense mutació.



PROCEDIMENT C

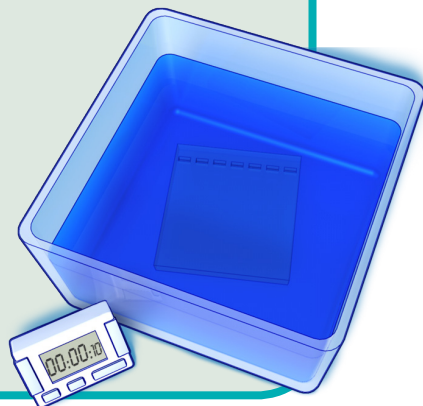
1

Treiem el gel dels seus suports i els submergim en una solució que el tenyirà (Stain Fast Blast) en un "contenedor" de mida apropiada apropiada durant uns 2 minuts.



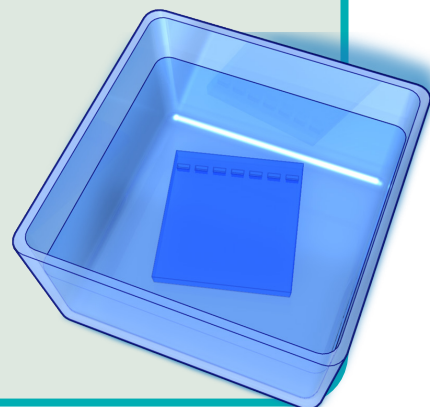
2

Transferim el gel a un "contenedor" més gran que contingui 500 ml d'aigua. Amb compte, movem el gel durant uns 10 segons per "aclairir-lo".



3

Ara cal que rentem el gel: El transferim a un tercer "contenedor" amb 500 ml d'aigua neta i el movem amb compte un cop cada minut, durant un total de 5 minuts.



4

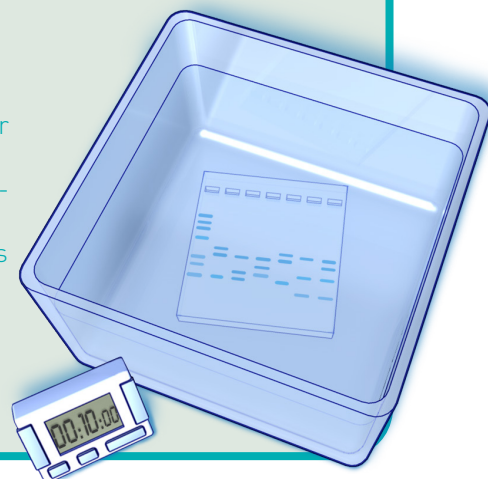
Fem un segon rentat tal com es descriu a l'apartat anterior.



5

Les bandes de DNA ja han d'aparèixer al gel tot i que seran bastant difuses. Si esperem entre 5 i 15 minuts aquestes seran menys borroses.*

* per obtenir un major contrast, seran necessaris rentats addicionals amb aigua.



Resultats i conclusions

?

10. Observa les bandes de DNA que has obtingut per a cada mostra de cada variant, i dibuixa els resultats a continuació. Indica també la longitud dels segments del marcador de DNA.

?

11. Quin ha estat l'efecte dels enzims de restricció en cadascuna de les variants?

Virus Africà

Virus Europeu

Virus Asiàtic

12. Hi ha alguna variant del VIH a la que l'enzim no hagi actuat?

?

13. Per tant, quina és la conclusió de la teva investigació? (fes referència a la hipòtesis inicial).

22



Sobre Irsicaixa

Què és Irsicaixa?

L'Institut de Recerca de la Sida IrsiCaixa és un institut de referència internacional que té com a objectiu contribuir a millorar els coneixements, la prevenció i els tractaments de la infecció pel VIH i la sida amb la finalitat última d'eradicar l'epidèmia.

Impulsat per la Fundació "la Caixa" i el Departament de Salut de la Generalitat de Catalunya, IrsiCaixa es va constituir el 1995 com a fundació privada sense ànim de lucre, i està situat a l'Hospital Universitari Germans Trias i Pujol de Badalona.

Dirigit pel Dr. Bonaventura Clotet, IrsiCaixa aplega més de cinquanta investigadors que es dediquen principalment a fer recerca bàsica per comprendre els mecanismes d'infecció pel VIH i poder desenvolupar així noves teràpies i vacunes. Alhora, IrsiCaixa participa en estudis clínics per avaluar les noves estratègies terapèutiques i coopera amb els països en vies de desenvolupament en la lluita contra la pandèmia a escala mundial.

La recerca científica de l'Institut de Recerca de la Sida IrsiCaixa es desenvolupa en coordinació amb els més prestigiosos centres de recerca internacionals, i les publicacions que se'n deriven es troben entre les que registren els més alts índexs d'impacte en aquest camp.

Annex

Precaucions de seguretat

INFORMA'T

Localitza els elements de seguretat del laboratori o l'espai habilitat per experimentar (extintors, dutes o bany, sortides, etc). Llegeix atentament les instruccions abans de fer un experiment. No oblidis llegir les etiquetes de seguretat de reactius i aparells.

UTILITZA VESTIMENTA ADEQUADA

Guants, bata i ulleres de protecció.

NORMES GENERALS

Està prohibit fumar, menjar o beure al laboratori o l'espai habilitat per experimentar. Treballa amb ordre, netedat i sense presses. Si es vessa un producte, recull-ho immediatament. Deixa sempre el material net i endreçat. No utilitzis mai un equip o aparell sense conèixer perfectament el seu funcionament. Renta't les mans abans de deixar el laboratori.

MANIPULACIÓ DEL VIDRE

Protegeix les teves mans quan manipulis material de vidre i estigues atent a la seva temperatura, ja que el vidre calent no es distingeix del fred. No utilitzis vidre esquerdat.

PRODUCTES QUÍMICS

No utilitzis cap flascó de reactius al que li falti l'etiqueta o que no estigui degudament identificat. No oloris, inhalis, provis o toquis els productes químics. No pipetegis mai amb la boca. Posa't guants i renta't les mans sovint si utilitzes productes tòxics o corrosius. En cas de contacte amb els ulls, neteja-te'ls immediatament amb aigua abundant. No apropis envasos de reactius a una flama. No escalfis líquids inflamables. Transporta les ampolles agafades del fons, mai de la boca.

ELIMINACIÓ DE RESIDUS

Diposita en contenidors especials i degudament senyalitzats tant els residus sòlids com líquids que així ho requereixin. Si tens algun dubte consulta l'educador. En cap cas s'abocaran residus sòlids a la pica.

RECORDA

En cas d'accident, avisa immediatament a l'educador.

PRECAUCIONS ESPECÍFIQUES PER A AQUEST TALLER

En aquesta pràctica manipularàs reactius químics, dissolvents i instruments que presenten els següents graus de perillositat:

Tampó TAE : És nociu per ingestió i pot provocar irritació ocular greu. Requereix ser eliminat com a residu especial.

Gel agarosa: Requereix ser eliminat com a residu especial. Donat que conté tampó TAE, cal seguir les indicacions abans especificades.

Solució de tinció del DNA (DNA stain Fast Blast): És nociu per ingestió. No cal eliminar-lo com a residu especial però sí diluït amb molta aigua.

Electroforesis: Cal prestar especial atenció al risc elèctric.

Xplore Health

DISCOVER THE LATEST ON HEALTH RESEARCH

Continua investigant a Xplore Health!



➔ www.xplorehealth.eu

Investigadors que han contribuït amb continguts: Marta Curriu, investigadora d'IrsiCaixa.

➔ DESENVOLUPAT PER

IrsiCaixa
Institut de Recerca de la Sida

Pare Científic
de Barcelona
B·KC

Obra Social
"la Caixa"



Aquesta obra està sota una llicència Attribution-NonCommercial-NoDerivs 3.0 Unported de Creative Commons. Per a veure una còpia d'aquesta llicència, visita <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/>