

MEDIOS Y RECURSOS DISPONIBLES PARA REALIZAR EL PROYECTO

El Laboratorio de Patología Molecular de la UGC de Anatomía Patológica (HUVR) cuenta con una habitación de aproximadamente 40m², junto con la posibilidad del uso compartido de otras dos habitaciones de 10m² pertenecientes a las instalaciones de la UGC de Anatomía Patológica. Cuenta con equipos específicos para la extracción y medición de ácidos nucleicos (QIACUBE, Espectrofotómetro Nanodrop, QUBIT), termocicladores para amplificación por PCR, PCR en Tiempo Real, equipo de pirosecuenciación [AB9700 y Gradient-PCR (Eppendorf); Rotor Gene Q (Qiagen); 7900 Fast PCR (AB); COBAS 4800 (Roche); PyroMark 24 (Qiagen)], dos equipos para la hibridación de ácidos nucleicos (Hibridizer de Dako y ThermoBrite de Abbott Molecular) y un equipo para la hibridación automatizada que se está terminando de poner a punto y validar (XmatrixNano), un microscopio de fluorescencia de Leica con 6 filtros distintos para estudio de fluoróforos de distintas longitud de onda (FITC, Gold, Aqua, FarRed, SpecRed, DAPI), sistemas de electroforesis (cubetas y fuentes de alimentación de corriente continua) y sistema de foto-documentación de geles. También dispone de los instrumentos necesarios para la construcción de las matrices de tejidos y para los estudios histológicos e inmunohistoquímicos, que incluyen: TMA workstation (Beecher Instruments), y sistemas Autostainer Link 48 (DAKO) y DAKO OMNIS.

En nuestro laboratorio en el Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBiS) disponemos también de todo el pequeño aparataje necesario para el desarrollo del proyecto: Termocicladores (GeneAmp® PCR System 9700, Applied Biosystems), Nanodrop 2000 (Thermo Scientific), Multiskan Spectrum (Thermo Scientific), PCR a tiempo real (7900 HT, Applied Biosystems), microcentrífugas, vortex, etc...

Dentro de las instalaciones del IBiS disponemos de los demás instrumentos necesarios, integrados en los diferentes Servicios de Apoyo del instituto:

- Servicio de Citometría de Flujo y Separación Celular: Citómetros analizadores Cytomics FC500 (Coulter) y LRS II Fortessa (Becton Dickinson), Separador magnético automático AutoMACS ProSeparator (Miltenyi Biotec), Separador celular High Speed MoFlo Cell Sorter (Beckman Coulter).
- Servicio de Histología: Procesador Automático de Tejidos LEICA ASP300S, para la deshidratación e inclusión de tejidos en parafina. Microtomos monitorizados LEICA RM2255. Criostatos LEICA CM1950, para cortes por congelación. Vibratomos LEICA VT1000S.
- Servicio de Microscopía: Microscopios de fluorescencia directos, microscopios de fluorescencia invertidos, microscopios de fluorescencia directos con programa CAST GRID para estereología, disector por láser, cariotipador, Microscopios confocales de barrido por láser.
- Servicio de Cultivo de Tejidos, Células y otros Microorganismos patógenos: Disponemos de varios espacios para cultivo en los laboratorios de nivel de contención biológica 2 (NCB-2), y en el laboratorio de nivel de contención biológica 3 (NCB-3).

- Servicio de Genómica y Secuenciación: Bionalizador 2100 (Agilent), secuenciador automático 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems), Plataforma de espectrometría de masas MassArray MALDI-TOF (SEQUENOM), Plataforma GeneChip (Affymetrix).

- En el complejo HUVR existen equipos NGS de Illumina para los que disponemos de libre acceso. De hecho, los resultados previos detallados en la sección anteriores, han sido obtenidos utilizando el secuenciador *MiSeq System*. También disponemos del equipamiento necesario para realizar los ensayos de PCR digital proyectados (*QuantStudio 3D Digital PCR*, ThermoFisher).

- Existe un sistema de historia clínica electrónica en HUVR-HUVM útil para el acceso y la gestión, por parte de la Unidad de Oncología Pediátrica intercentros, de los datos clínicos relevantes para el proyecto.

PRESUPUESTO: El proyecto se ejecutará en dos fases. La fase inicial (3 meses) será crítica para la puesta a punto de los métodos de extracción de RNA a partir plasma/exosomas y TEP y es la fase para la que se solicita la ayuda de 10.000 euros, que revertirán en la contratación de personal para llevar a cabo los estudios y levantamiento de bases de datos.

CONCEPTOS	PRESUPUESTO SOLICITADO		
	FASE 1 (3 meses)	FASE 2 (hasta finalizar proyecto. 2 años)	TOTAL
<p>Bienes y Servicios:</p> <p>Material científico de investigación :</p> <p>Aislamiento de exosomas Tubos de policarbonato (BD)/Tubos de gradiente de densidad Kits de exoEASY (Midi, Qiagen) Polímero para aislamiento de vesículas: Total Exosome Isolation (Invitrogen) y Exo-Quick (BioSystems) Reactivos para cultivos: FBS libre de exosomas, RPMI, DMEM, flasks con filtro, pipetas, antibiótico, Filtros estériles con botella 0,45um low protein binding Tubos estériles de 50ml para centrifugación.</p> <p>Extracción de RNA, será distinta según el material de partida: Muestras FFPE: kit Agencourt FormaPure (Beckman Coulter) Plasma / exosomas: miRNAeasy, MagMAX™ mirVana™ Total RNA Isolation</p> <p>Cuantificación del RNA, Qubit RNA HS Assay que requiere el fluorímetro QUBIT.</p> <p>Reactivos para las reacciones de secuenciación (Flow Cells): MiniSeq High Output Kit (300 cycles) # FC-420-1003: 1472 EUR/unidad. Necesitaremos 20 unidades.</p> <p>Reactivos preparación de librerías (Archer™ FusionPlex™ Sarcoma Kit for Illumina®). El pasado año fuimos apoyados por Archer con varios kits para el impulso inicial del proyecto pero no serán suficientes para todas las muestras previstas.</p> <p>Reactivos cuantificación de librerías (KAPA)</p> <p>Reactivos RT-PCR y secuenciación Sanger para confirmación de los resultados de secuenciación masiva.</p> <p>Reactivos dPCR para QuantStudio 3D Digital PCR System y Sondas TaqMan</p> <p>Sondas y reactivos FISH</p> <p>Anticuerpos y reactivos para inmunohistoquímica</p> <p>Contratación de servicios externos y arrendamiento de equipamiento de investigación: (traducciones, realización de encuestas, mensajería, realización de técnicas específicas, etc.). Se deberá indicar el tipo de servicio a contratar y la necesidad del mismo.</p> <p>Transacción biorrecursos Biobanco SSPA</p> <p>Servicios Generales del IBiS (para análisis RNA en Bioanalyzer, uso de cuarto de cultivos, gastos de uso de ultra-centrifuga)</p>			

Personal:			
Licenciado / postdoctoral			
	10.000	70.000	80.000
Total personal:			
TOTAL			80.000
<p>Descripción y justificación de la necesidad: (indicar conceptos, unidades, congresos, reuniones, etc., si no se encuentra justificada se eliminará del presupuesto)</p> <p>Contamos con recursos para la adquisición de bienes y servicios listados arriba. Sin embargo, los investigadores con más responsabilidad e implicación en este proyecto no tienen asegurada actualmente financiación para su actividad laboral. Por ello, solicitamos ayuda en el apartado de personal, con un periodo inicial de puesta en marcha de 3 meses, y un periodo posterior de 21 meses, hasta cumplir los dos años previstos del proyecto. El personal será necesario para llevar a cabo todo el trabajo manual de gestión y análisis de las muestras de biomarcadores circulantes.</p>			