

NORMAS DE UTILIZACIÓN DEL SERVICIO DE PROTEÓMICA

1. Consultar la descripción de la Oferta de Análisis.
2. Consultar la Lista de Precios.
3. Contactar con el Personal Técnico del Servicio.

Recepción y control de muestras:

- Antes de preparar las muestras es recomendable que os pongáis en contacto con el **personal técnico del servicio** para discutir el trabajo y poder así programar el tipo de análisis más adecuado.
- Una vez establecido el flujo de trabajo se confecciona un **presupuesto** que debe de ser aceptado y firmado por el IP del laboratorio.
- El horario de recepción de muestras es de lunes a viernes de 9 a 14 horas. Es recomendable avisar, vía e-mail o teléfono, previo a la entrega de muestra/s.
- En el día de la entrega de muestras, el usuario cumplimentará **la plantilla de recepción de muestras**. Los usuarios ajenos al C.B.M.S.O., además, deberán cumplimentar un impreso de **solicitud de servicio**.
- El usuario será dado de alta en la lista de tareas pendientes sólo cuando se haya entregado el presupuesto firmado, rellenado la plantilla y recibido la muestra correctamente. La petición por parte del usuario de un nuevo análisis tendrá la fecha de recepción con que se comunica esta nueva petición, aunque la muestra haya sido entregada previamente en el servicio.
- El tiempo de respuesta dependerá del volumen de trabajo, del estado de los equipos y del tiempo de análisis para cada proyecto. Una vez concluido, nos pondremos en contacto con el usuario vía e-mail o teléfono y se entregarán los resultados en formato html, Excel y ppt. Para entregar ficheros de gran tamaño empleamos *Wetransfer*.

Normas generales de preparación de muestras:

- Los tubos que se utilicen durante todo el proceso de preparación de muestra deberán ser marca "Eppendorf" (para evitar contaminaciones procedentes del plástico).

➤ GELES

- Deberán entregarse intactos y húmedos. **No se aceptarán bandas o spots de proteínas recortados por el usuario.**
- Dada la sensibilidad de las técnicas de espectrometría de masas, la identificación de proteínas a alta sensibilidad requiere una cuidadosa manipulación de la muestra. Los geles se deben preparar con reactivos de grado analítico, agua MQ, se polimerizarán el día anterior a la carrera (preferentemente el "resolving") y se manipularán con extremo cuidado para evitar contaminación de queratinas por parte del usuario que suelen proceder de manos, pelo y ropa de tejido animal. Recomendamos que todos los recipientes empleados sean de vidrio y no de plástico y que no hayan sido utilizados para otros fines que puedan contaminar el gel (pej. "Western-blot", dado que la BSA o la leche molico impregnarían el gel de otras proteínas).

- Deben extremarse las condiciones de preparación de muestra para minimizar la contaminación interna de queratinas en la muestra a analizar mediante electroforesis.
- La identificación de proteínas mediante espectrometría MALDI-TOF seguida de "peptide-mass-fingerprinting" requiere que las bandas de proteínas contengan una única proteína mayoritaria. Esta situación se consigue óptimamente analizando la muestra mediante electroforesis bidimensional. Si el usuario no tiene medios o experiencia para la confección de estos geles deberá intentar enriquecer, fraccionar... la muestra de tal forma que la banda/s que quiera identificar esté definida y contenga el mínimo número de proteínas.
- Adicionalmente a los carriles que contengan la muestra deben correrse en carriles paralelos estándares de peso molecular (no preteñidos, no coloreados, no recombinantes...) con cantidades conocidas (1 a 2 µg de cada proteína para geles teñidos con Coomassie y 0.1 a 0.3 µg para geles teñidos con fluoróforos). Es recomendable poner tampón de muestra con azul de bromofenol en todos los pocillos (incluso los vacíos) para tener un frente de electroforesis definido.
- La tinción del gel puede llevarse a cabo con **Coomassie "casero"** (0.2% Coomassie en Metanol:Acético:Agua en una proporción 50:10:40 y destinción en la misma proporción de Metanol:Acético:Agua), **Coomassie Coloidal** (protocolo del fabricante, recomendable fijar el gel en Metanol:Acético:Agua en una proporción 50:10:40) ó **agentes fluorescentes (SYPRO Ruby)**; para esta tinción la fijación del gel se realizará en Metanol:Acético:Agua en una proporción 50:10:40 y los lavados posteriores se realizaran en Metanol:Acético:Agua, 10:7:83, solución en la cual permanecerá el gel hasta su entrega en el Servicio.
- **No recibimos geles teñidos con plata.** Este tipo de tinción modifica drásticamente las proteínas dificultando la digestión enzimática, carece de rango dinámico y no hay una correlación entre intensidad de tinción y cantidad de muestra.
- En cada tanda de muestras, el servicio efectúa rutinariamente un control interno de digestión (normalmente estándares del propio gel, que NO podrán ser preteñidos ni modificados) así como un control externo (muestras de otros geles previamente caracterizadas), para comprobar el correcto rendimiento del proceso de digestión y, sobre todo, para monitorizar la presencia de queratinas y/u otros contaminantes que interfieran o inhiban la digestión, o de otros problemas atribuibles al tratamiento realizado en el laboratorio del usuario.
- Cuando el análisis MALDI-TOF indique que el grado de contaminación residual de queratinas sea excesivamente alto, se dará por terminado el análisis de esa muestra, no procediéndose a un análisis posterior mediante fingerprinting o mediante trampa iónica.

➤ **PROTEOMAS**

- Para el análisis de IPs (immunoprecipitaciones), Pull-down, subproteomas o proteomas, ponerse en contacto con el personal técnico del Servicio para diseñar el trabajo.
- No hay un procedimiento estándar, hay que adaptarlo a cada objetivo en particular así como a la idiosincrasia de la muestra (cantidad de proteína, origen, concentración, solventes...).