

VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN Y TRANSFERENCIA**EL SECRETARIADO DE INFRAESTRUCTURA CIENTÍFICA Y DESARROLLO TECNOLÓGICO****INFORMA****ESTACIÓN DE DETECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE AMPLIO ESPECTRO DE BIOMOLÉCULAS.**

El Grupo de Investigación Biología y Comunicación Celular ha incorporado en las dependencias del Departamento de Fisiología de la Facultad de Veterinaria un sistema de **“ESTACIÓN DE DETECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE AMPLIO ESPECTRO DE BIOMOLÉCULAS”** con cargo al proyecto **EQC2019-006153-P** concedido por el Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades a través de las Ayudas para la Adquisición de Equipamiento Científico-Técnico correspondientes al Subprograma Estatal de Infraestructuras de Investigación y Equipamiento Científico-Técnico (Plan Estatal I+D+i 2017-2020) (convocatoria 2019), cofinanciado por la Agencia Estatal de Investigación (AEI) y el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER), y la Junta de Extremadura, cuyo Responsable Científico es el investigador **José Antonio Tapia García**.

OBJETIVO Y FUNCIONALIDAD DEL EQUIPAMIENTO ADQUIRIDO

Proyecto EQC2019-006153-P: Estación de detección y caracterización de amplio espectro de biomoléculas.

Características del equipamiento adquirido

El equipamiento adquirido permite realizar determinaciones de biomarcadores, en un amplio rango de detección en un solo laboratorio ubicado en la Facultad de Veterinaria. Estos equipos son accesibles a investigadores con actividad en este Centro, incluyendo a aquellos pertenecientes al edificio del Hospital Clínico Veterinario de la UEx, al edificio de Bioquímica y al edificio de Química Orgánica, todas ellas localizaciones muy próximas.

Los sistemas adquiridos son de alto rendimiento con gran sensibilidad y precisión. Permiten realizar diferentes tipos de análisis relacionado con fluorescencia o quimioluminiscencia, además de análisis multiplexing, siendo capaces de detectar niveles muy bajos de emisión de luz para la realización de análisis muy precisos.

La estación está gobernada por un único sistema informático y consta de los siguientes componentes: 1) Lector de placas multimodal. 2) Documentador de imágenes de *Western blotting* por quimioluminiscencia, fluorescencia e infrarrojos; y 3) Lavador automático de microplacas. Características más específicas se detallan a continuación:

El lector de placas multimodal, modelo *BMG Clariostar plus*

- Una unidad básica para detección de fluorescencia y FRET con monocromadores lineales variables de 8 a 100 nm, filtros, o una combinación de ambos.
- Lectura de absorbancia UV-Vis con espectrómetro Diodo Array.
- Detección de luminiscencia.
- Lectura superior o inferior.
- Accesorio para fluorescencia Polarizada.
- Placa LVis para lectura en Cubetas y de muestras de 2 μ l.
- Incubación hasta 65°C.
- Agitación.
- Software de control y análisis.

FLUORESCENCIA MEDIDA DESDE ENCIMA DE LA PLACA:

- Selección de longitud de onda con monocromador con filtros, o con una combinación de monocromador y filtros simultáneamente.
- Lectura con ajuste de altura focal “z” en pasos de 0,1 nm.
- Sensibilidad con lectura por encima de la placa obtenida en placa de 384 pocillos.
 - Monocromador: <0,35 pM (fluoresceína)
 - Filtros: <0,15 pM (fluoresceína)
- Selección automática a través del software de modos de lectura, tanto con filtros, como con monocromadores.
- Barridos espectrales de excitación, emisión o ambos.
- Escaneado del fondo del pocillo con resolución mínima de 800 puntos.

FLUORESCENCIA MEDIDA DESDE DEBAJO DE LA PLACA:

- Ajuste de altura focal “z” en pasos de 0,1 nm
- Sensibilidad con lectura desde abajo medido en placa de 384 pocillos.
 - Monocromador: <3 pM (fluoresceína)
 - Filtros: <1 pM (fluoresceína)

FLUORESCENCIA POLARIZADA ULTRAVIOLETA / VISIBLE

- Sensibilidad: <1 pM SD a 1 nM. Fluoresceína en placa de 384 pocillos.
- Rango: 240 a 750 nm
- Lectura desde arriba o desde debajo con ajuste de altura focal “z” en pasos de 0,1 nm, tanto para la lectura desde abajo como para la lectura desde arriba.
- Escaneado del fondo del pocillo con resolución mínima de 800 puntos.

FLUORESCENCIA EN TIEMPO RESUELTO / TR-FRET

- Sensibilidad: TRF: 40 fM Europium, 384 sv
- Lectura desde arriba o desde debajo con ajuste de altura focal “z” en pasos de 0,1 nm, tanto para la lectura desde abajo como para la lectura desde arriba.
- Certificado por CisBio para la realización de HTRF- TR-FRET tanto en placa negra como con placa blanca.

LUMINISCENCIA:

- Sensibilidad: <math><10\text{ amol/pocillo ATP}</math> en placa de 384 pocillos.
- Lectura desde arriba o desde debajo con ajuste de altura focal “z” en pasos de 0,1 nm, tanto para la lectura desde abajo como para la lectura desde arriba.
- Los monocromadores permiten seleccionar la longitud de onda y el ancho de banda requeridos, así como realizar barridos espectrales en pasos de 0,1 nm.
- Escaneado del fondo del pocillo con resolución mínima de 800 puntos.

ABSORBANCIA

- Rango: 230 a 900 nm.
- Selección de cualquier longitud de onda y barridos espectrales.
- Alta velocidad de barrido espectral, que permita hacer un barrido completo en un rango de 230 a 900 nm, en intervalos de 1 nm, en un tiempo de 1 segundo por pocillo.
- Rango Dinámico: 0-4 OD.
- Exactitud: <math><0,5\% \text{ OD}</math> en un rango de 0-2 OD.
- Con ajuste automático de paso de luz.

FILTROS

- El equipo permite la colocación simultánea de 4 filtros de excitación y 4 filtros de emisión, y sus dicróicos respectivos, con reconocimiento automático de los mismos, permitiendo al usuario combinar los filtros de Ex y Em a voluntad.

OTRAS CARACTERÍSTICAS

- El equipo Incluye un paquete informático con software de control y análisis, en entorno Windows, que permite definir y grabar protocolos y aplicaciones, definir microplacas, inyecciones, agitaciones, pudiéndose además visualizar los datos en tiempo real en distintos formatos, e incluso variar las condiciones del ensayo sobre la marcha.
- El software de análisis posee posibilidad de exportación a Excel, creación de plantillas de análisis automático, etc...

Documentador de imágenes, modelo Biorad Chemidoc MP imaging system

El sistema dispone de las siguientes especificaciones:

- Cámara CCD monocroma de 16 bits, 65.536 niveles de grises. Resolución: 6Mp. Resolución efectiva: 18 Mp. Eficiencia cuántica a 425nm: 73%. Refrigeración regulada: -57°C. Lentes con autofocus f0.95.
- Rueda de filtros automática (con 7 posiciones de filtros diferentes)
- Transiluminador regulable en altura automatizado para mejorar el enfoque.
- Posibilidad de realizar largas exposiciones que permita realizar aplicaciones con la tecnología *stain-free* para cuantificar la carga total de proteínas en gel.
- Detección y análisis de blots por quimioluminiscencia con baja emisión de luz.
- Cámara oscura compacta con luz blanca tipo LED y diferentes tipos de iluminación LED (Epi-UV, Epi-rojo, Epi-azul, Epi-verde).
- Ofrece imagen a tiempo real para facilitar el posicionamiento del gel y el enfoque.

Lavador de placas, modelo Intelispeed Washer IW-8

El sistema dispone de las siguientes especificaciones:

- Control a través de microprocesador interno, con pantalla LCD de 3,5" y programación sencilla.
- Volumen de lavado: 50-950 µl/pocillo en intervalos de 50 µl.
- Volumen residual: <0,5 µl/pocillo.
- Tiempo de aclarado y de agitación: 0 a 999 s.
- Tiempo de aspiración: ajustable desde 0,1 a 9,9 s.
- Incluye tres botellas de 3 L para líquidos de lavado y una para desecho.
- Alarma para falta de líquidos de lavado.





Fotografías de los equipos adquiridos con cargo al proyecto EQC2019-006153P,

Estación de detección y caracterización de amplio espectro de biomoléculas:

- A) Vista general del equipo lector de placas, modelo *BMG Clariostar plus*.
- B) Vista general del equipo documentador de imágenes, modelo *Biorad Chemidoc MP imaging system*.
- C) Vista general del equipo lavador de placas, modelo *Intelispeed Washer IW-8*.

Valor añadido e impacto científico-tecnológico de la adquisición

No existe ninguna estación de características equivalentes en el entorno de la Facultad de Veterinaria de Cáceres. En estos edificios, aunque existen equipos individuales gestionados por grupos de investigación, la mayor parte de ellos son obsoletos y tienen un acceso restringido. Además, en ningún caso se organizan de forma integrada en las dependencias de la Facultad de Veterinaria e instalaciones anexas (Química, Bioquímica y Hospital Clínico Veterinario).

La adquisición de los equipos descritos debería consolidar los resultados generados por los grupos implicados en la solicitud de este proyecto, puesto que pone a su disposición una tecnología que permite elaborar de forma rápida y precisa todos aquellos estudios que impliquen la determinación de biomarcadores basados en sondas fluorescentes, colorimétricas o quimioluminiscentes. Los equipos adquiridos deberían permitir que estos análisis cuantitativos y cualitativos sean más eficaces, precisos y rápidos. y permitirán la utilización de todas aquellas aplicaciones que requieran la inclusión de marcajes con sondas no radioactivas, haciendo que las posibilidades de detección sean prácticamente universales para los marcadores actuales. Este equipamiento, por tanto, deberá contribuir al fortalecimiento de las capacidades científico-técnicas de los grupos de investigación implicados en la solicitud y a mantener la competitividad.

Técnicas o investigaciones que el equipo permitirá desarrollar o abordar

Los equipos son complementarios entre sí y abarcan un amplio rango de detección. Las aplicaciones previstas del equipo inicialmente son:

- Documentación de ácidos nucleicos (EtBr, SYBR Safe dyes, ...)
- Detección colorimétrica de proteínas (coomassie, ponceau, tinción de plata, ...)
- Autoradiografías
- Fluorescencia convencional
- Fluorescencia polarizada
- Fluorescencia en espectro infrarrojo
- Fluorescencia en espectro ultravioleta
- Análisis de imágenes mediante multiplexing (*Western blotting*).
- Quimioluminiscencia (*Western blotting*).
- Quimioluminiscencia (*ensayos enzimáticos con luciferasa*).
- Bioluminiscencia
- ...

Equipo responsable y potencial de utilización por parte de otros grupos de investigación

Los equipos que constituyen la *Estación de detección y caracterización de amplio espectro de biomoléculas* están localizados en el laboratorio *in vitro* del Grupo de Investigación BIOLOGÍA Y COMUNICACIÓN CELULAR (BICOMCEL), localizado en el Edificio de Departamentos de la Facultad de Veterinaria.

El investigador responsable de la estación se ocupa de establecer un cronograma para evitar el solapamiento en la adquisición y análisis de datos y un control por escrito del uso del equipo donde cada investigador que lo utilice debe indicar (1) el grupo al que pertenece, (2) el tiempo de uso de cada experimento y (3) las condiciones experimentales empleadas en la adquisición.

Respecto al análisis de los resultados, el software de análisis de cada uno de los equipos que lo requieren es libre y puede ser instalado en cualquier equipo, por lo que los investigadores pueden analizar las muestras adquiridas de forma independiente.

Las condiciones de uso prevén que los gastos comunes de la estación (incluyendo las revisiones periódicas y las posibles reparaciones) serán abonadas por los responsables de los grupos de investigación proporcionalmente a la intensidad de uso del equipo por parte de los investigadores de su grupo. Los gastos específicos de cada experimento (sondas fluorescentes, y obtención, tratamiento y preparación de las muestras), corren a cargo del investigador principal del proyecto para el que se realiza el experimento.

Producción Científica

Aún no disponible (instalación completada en noviembre de 2021)