



ibima

Instituto de Investigación
Biomédica de Málaga

ECAI de Proteómica de IBIMA
Normativa Interna

Versión 02 - 20/10/2014



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



INDICE

1. Introducción	2
2. Política de actuación de IBIMA en el apoyo de la investigación realizada en el marco de las Unidades de gestión clínica de la provincia de Málaga, Andalucía.	2
3. Marco de actuación	2
4. Consideraciones éticas en la conducta y reconocimiento de la investigación: autoría y contribución.....	3
5. Procesos y Procedimientos para el apoyo de la investigación en las Unidades Clínicas	3
6. Servicios para el apoyo de la investigación en las Unidades Clínicas .	4
7. Objetivos para el apoyo de la investigación en las Unidades Clínicas.	5
8. Equipamiento para el apoyo de la investigación en las Unidades Clínicas	5
ANEXO	9

1. Introducción

Esta normativa tiene como objetivo presentar la cartera de servicios ofrecidos por la ECAI Proteómica de IBIMA, informar sobre los procedimientos seguidos para ejecutar los mismos y dar a conocer las consideraciones éticas y de reconocimiento a los servicios prestados por los que se rige la ECAI. Se pone a disposición del investigador los anexos necesarios para solicitar un determinado servicio. Además se pone a disposición del investigador el formulario de evaluación del servicio prestado y una hoja de reclamaciones.

2. Política de actuación de IBIMA en el apoyo de la investigación realizada en el marco de las Unidades de gestión clínica de la provincia de Málaga, Andalucía.

La investigación apoyada por IBIMA debe cumplir la normativa marcada por la RCE (Red de Comités de Ética de Universidades y Organismos Públicos de investigación (<http://www.ub.edu/rceue/index2.htm>) que vela por que el trabajo cumpla con los más altos estándares científicos, se realice de manera segura y respete los deseos e integridad de los pacientes o voluntarios involucrados.

3. Marco de actuación

IBIMA cuenta con la ECAI de Proteómica con una concepción multidisciplinar que aúna la experiencia profesional de bioquímicos, biólogos moleculares y químicos de proteínas para establecer un puente entre las metodologías proteómicas más actuales e innovadoras y la investigación básica, aplicada y clínica que se desarrolla en nuestro entorno, incluyendo grupos de investigación, unidades clínicas y empresas del sector biotecnológicos, agroalimentario y farmacéutico.

La ECAI ofrecerá servicio a otros investigadores no pertenecientes a IBIMA y dichos servicios estarán sujetos a una priorización y costes especificados en el anexo (TARIFAS). La ECAI organizará cursos de formación para usuarios, principalmente dirigidos a la optimización de protocolos y análisis de datos así como sesiones de divulgación de las aplicaciones de sus servicios en el ámbito de la investigación biomédica. Los servicios prestados por la ECAI Bioinformática cumplen con la normativa y política de actuación de IBIMA.

Los servicios prestados por la ECAI PROTEÓMICA cumplen con la normativa y política de actuación de IBIMA.

4. Consideraciones éticas en la conducta y reconocimiento de la investigación: autoría y contribución

Estos son los requisitos de IBIMA relativos al reconocimiento de los servicios prestados por la ECAI PROTEÓMICA. Dichos requisitos cubren todos los servicios prestados a cualquier labor investigadora llevada a cabo por cualquier grupo de investigación, Unidad clínica, empresa o Institución comprendida en la organización de IBIMA.

IBIMA se rige bajo los requisitos del Comité Internacional de editores de revistas científicas médicas: (The ICMJE) (<http://www.icmje.org/>) expuestos más adelante. Según dichos requisitos IBIMA requiere que el autor responsable de cualquier tipo de publicación científica reconozca públicamente y como corresponda la actividad o actividades llevadas a cabo por la ECAI PROTEÓMICA basándose en los siguientes criterios:

- Identificar como **autor** a aquel personal de IBIMA que cumpla con los 4 criterios expuestos por el ICMJE que designan autoría en la publicación
- **Incluir en la sección de Materiales y métodos** por la ECAI cuando dicho servicio implique la prestación de métodos y tecnologías proteómicas esenciales en la obtención de los resultados mostrados en el manuscrito, bien de su totalidad o de una parte de los mismos. El autor deberá identificar a la ECAI de IBIMA como el proveedor de dicho servicio, incluyendo un texto similar al listado a continuación para constar el servicio realizado. Los detalles específicos del texto a incluir serán proporcionados al autor por la ECAI PROTEÓMICA en el informe de ejecución y resultados del servicio demandado:
 - “El análisis proteómico fue realizado por la ECAI PROTEÓMICA de IBIMA, Málaga (España) con el equipo xxxxxxxx con software xxxxx (versión X.Y)”
- **Agradecer** individualmente y especificar la contribución de la ECAI BIOINFORMÁTICA de IBIMA utilizando el texto más apropiado de los que se sugieren a continuación:
 - “Agradecemos a *nombre* (IBIMA) la asesoría en el (diseño metodológico) *servicio* o su útil discusión científica.”
 - “Agradecemos a *nombre* (IBIMA) su apoyo en la realización del servicio (diseño metodológico) o su lectura crítica del manuscrito (o de la memoria del estudio)”.
- **Exponer** el logo de IBIMA en caso de que el trabajo se vaya a exponer en un póster

5. Procesos y Procedimientos para el apoyo de la investigación en las Unidades Clínicas

Los servicios de la ECAI se integran en los procesos generales siguientes:

- Realización de análisis de muestras que comprende los siguientes procedimientos:

- Preparación de la muestra para su análisis por las diferentes metodologías proteómicas
- Realización del análisis
- Obtención de resultados, en algunos casos priorizados por puntuación empleando el motor de búsqueda MASCOT y bases de datos bioinformáticas del National Center For Biotechnology Information (NCBI) y SwissProt
- **Asesoramiento metodológico** a demanda del investigador
- **Asesoramiento científico** a demanda del investigador
- **Formación de los profesionales.** Impartir sesiones formativas e informativas en investigación proteómica

La ECAI Proteómica recoge las peticiones de servicios en un formulario had-oc (anexo) en los que se especifican los requisitos de la ECAI para la ejecución del mismo, su firma supone la aceptación de la normativa aquí expuesta. La ECAI Proteómica aplica a cualquier servicio un criterio de prioridad siguiendo los “niveles de prioridad” anexos y proporciona una fecha estimada de ejecución del servicio solicitado que contempla la duración neta del servicio solicitado y el criterio de prioridad del mismo y la carga de trabajo del personal de la ECAI. La modificación del servicio solicitado durante el periodo de ejecución del mismo supondrá la variación de la fecha de ejecución original que habrá de considerar las modificaciones solicitadas siguiendo los criterios anteriormente descritos. La ECAI Proteómica se compromete a cumplir con la fecha de ejecución proporcionada. La ECAI Proteómica elabora un informe final con los resultados del servicio solicitado que proporcionará al investigador antes o en la fecha de ejecución. La ECAI Proteómica será evaluada anualmente mediante el análisis de los indicadores de productividad acordados con IBIMA.

La ECAI Proteómica solicitará al investigador que rellene un formulario de evaluación (anexo) del servicio para poder evaluar su funcionamiento e implementar medidas de optimización y/o resolutivas.

La ECAI de IBIMA dispone de una hoja de reclamaciones a disposición del cliente.

6. Servicios para el apoyo de la investigación en las Unidades Clínicas

- Medidas de espectros de excitación y emisión de fluorescencia, cinéticas fluorescentes, estudios de quenching de fluorescencia, medida de Ca²⁺ intracelular, polarización de fluorescencia, determinación de constantes de unión y disociación de ligandos a proteínas, determinación de cinéticas rápidas (en el rango de 10-100 ms).
- Identificación de proteínas procedentes de tacsos de geles de electroforesis de una o dos dimensiones, así como de proteínas en disolución. Se pueden realizar espectros de masas/masas (MSn), mediante sucesivas fragmentaciones de los iones

precursores, lo que permite realizar secuenciación de péptidos. También permite aplicaciones en Metabolómica.

- Análisis, separación y valoración cuantitativa de mezclas complejas de proteínas, péptidos, aminoácidos, hormonas y fármacos mediante FPLC (Fast-Protein Liquid Chromatography) y HPLC (High-Performance Liquid Chromatography).
- Determinación de la masa molecular exacta y de modificaciones postraduccionales en proteínas y péptidos con equipos MALDI-TOF/TOF, Q-Exactive Orbitrap y trampa de iones ETD-AMAZON con ionización por electrospray (ESI).
- Realización de perfilados proteicos en muestras clínicas empleando electroforesis bidimensional fluorescente diferencial (2D-DIGE) y MALDI-TOF/TOF.
- Búsqueda y caracterización de biomarcadores en muestras clínicas por separación con tecnología Protein-Chip array y análisis por espectrometría de masas SELDI-TOF.
- Generación de perfilados y mapas proteicos in situ sobre cortes de tejido mediante tecnología MALDI-IMAGING en espectrómetro de masas Ultraflexextreme-MALDI-TOF/TOF.

7. Objetivos para el apoyo de la investigación en las Unidades Clínicas

- Procesamiento y análisis proteómico de muestras de investigación básica y clínica.
- Asesoramiento a los usuarios en todas las técnicas proteómicas.
- Formación en proteómica mediante cursos y seminarios de divulgación y especialización.
- Mejora continua de los servicios ofrecidos.
- Incorporación de nuevas técnicas y actualización de las ya establecidas

8. Equipamiento para el apoyo de la investigación en las Unidades Clínicas

En la actualidad, dispone de los siguientes equipos (véase información más ampliada en el anexo instrumentación):

ESPECTROFLUORÍMETRO MODULAR PTI QUANTAMASTER QM-2000-6SE con regulación de la temperatura por módulo Peltier y accesorio Stopped-Flow para cinéticas rápidas.

ESPECTRÓMETRO DE MASAS DE TRAMPA DE IONES CON IONIZACION ESI (off line, on-line), modelo AMAZON Speed-ETD Dual Funnel de la casa Bruker.

NANO-HPLC DE AGILENT TECHNOLOGIES 1200 SERIES. El nano-HPLC está conectado online con el espectrómetro de masas, permitiendo flujos de 200-300 nL/min. Se puede realizar el análisis de mezclas complejas de proteínas ya que son previamente enriquecidas y fraccionadas en varias nano-columnas de HPLC.

DIGESTOR AUTOMÁTICO PARA APLICACIONES DE PROTEÓMICA (INTAVIS). Equipo robotizado que permite la digestión proteolítica automática de hasta 96 muestras en formato de placa de ELISA. El rango de concentración desde fmol hasta mmol. Los fragmentos de geles a procesar están comprendidos entre 1-30 mm³. El equipo posee múltiples viales para diferentes solventes y reactivos (más de 20), varios de ellos refrigerados y con capacidad calefactora de hasta 80°C. Los volúmenes a dispensar comprendidos en un rango entre 0.5 y 100 µl y la operación se realiza con una gran precisión y rapidez. Posee sistemas de lavado, elución y concentración de los péptidos empleando tecnología ZipTips. La instrumentación está controlada desde un PC con un software compatible con Windows, con software gráfico y que puedan ser exportados a otros programas para documentación. Es un equipo ideal para procesar múltiples muestras para análisis posterior por espectrometría de masas y evitar las contaminaciones frecuentes cuando se realizan digestiones proteolíticas manuales

SISTEMA TÁNDEM DE PROTEIN-CHIP + ESPECTRÓMETRO DE MASAS SELDI-TOF (BIORAD).

- **ProteinChip arrays:** Se trata de una base metálica conteniendo una superficie químicamente tratada (resina de intercambio catiónico, aniónico, de quelación por metales, hidrofóbica, etc...) o, alternativamente, una superficie reactiva a la que puedan unirse moléculas con actividad biológica (anticuerpos, receptores, etc...) para conseguir una interacción específica con las proteínas de interés que se pretenden analizar y caracterizar. Cada ProteinChip array es de longitud similar a una columna de una placa de ELISA de 96 pocillos, conteniendo 8 pozillos donde la muestra es depositada. Los pozillos han de ser de 2 mm de diámetro y marchados A-H, para que sean compatibles con sistemas de pipetas multicanal y sistemas de pipeteo automatizados. Los chips de proteínas requieren disoluciones tampón de pH y fuerza iónica adecuadas para la elución selectiva de proteínas, así como el empleo de ProteinChips estándar y controles para calibrar el equipo.
- **ProteinChip SELDI-TOF reader:** Este equipo es en realidad el espectrómetro de masas MALDI-TOF, que se acopla a los ProteinChip arrays donde se ha depositado la muestra. Realiza la desorción e ionización de la muestra mediante un láser de nitrógeno y la determinación de su relación m/z mediante un detector de tiempo de vuelo (TOF) para analizar cantidades mínimas de proteínas selectivamente capturadas en el ProteinChip array. Permite una sensibilidad en la escala del attomol.

HPLC PARA ANÁLISIS DE METABOLITOS EN MUESTRAS BIOLÓGICAS Y CLÍNICAS (AGILENT). Equipo de HPLC con bomba cuaternaria para 4 canales de fase móvil, desgasificación de disolventes de la fase móvil por vacío, inyector automático de muestras,

detector UV/visible, detector de fluorescencia, horno para termostatación de columnas, colector de fracciones, unidad de refrigeración de fase móvil, software de control y análisis de datos.

EQUIPO COMPLETO DE ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL (2D) DIFERENCIAL CUANTITATIVA CON TINCIÓN POR MULTIFLUORESCENCIA (DIGE) (BIORAD). El sistema incluye una unidad de enfoque isoeléctrico, una unidad de electroforesis vertical de análisis simultáneo de geles de poliacrilamida, un sistema de análisis de imagen con láseres fluorescentes, software de análisis diferencial de geles y membranas multifluorescentes y un robot de picado automático de manchas.

ESPECTRÓMETRO DE MASAS MALDI-TOF-TOF ULTRAFLEXtreme™ con plataforma MALDI-IMAGING PARA PROTEÓMICA, METABOLÓMICA Y LIPIDÓMICA. Espectrómetro de masas que permita obtener masa exacta y elevada resolución espectral trabajando en modo MS y en modo de fragmentación MS/MS. Se requiere un equipo que permita el análisis de proteínas intactas ("top-down proteomics"), la secuenciación de novo de péptidos, la identificación de proteínas y control de calidad, la identificación de biomarcadores y la posibilidad de obtener perfiles proteicos y lipídicos en tejido intacto ("tissue imaging mass spectrometry").

FPLC (FAST-PROTEIN LIQUID CHROMATOGRAPHY) DUO-FLOW (BIO-RAD). Equipamiento proteómico de FPLC para purificación de proteínas y péptidos por cromatografía líquida de baja presión y empleo de diferentes modos de separación cromatográfica (filtración en gel, intercambio iónico, interacción hidrofóbica, adsorción, afinidad, etc.). El sistema integra dos bombas y un controlador de la fase móvil, sistema automático de software de control, inyector de muestra de volumen variable, célula de flujo con detección UV-visible, bomba peristáltica y colector de fracciones.

SISTEMA BIO-PLEX PARA ANÁLISIS DE INMUNOENSAYOS EN MULTIPLEX. Un equipo BioPlex para análisis de inmunoensayos en multiplex, para validación de biomarcadores que hayan podido detectarse por la tecnología DIGE. El sistema incorpora la última tecnología para la detección y validación de biomarcadores en multiplex usando detección por láser. Bio-Plex permite la detección y cuantificación de múltiples analitos (proteínas, péptidos o ácidos nucleicos) en un único volumen de muestra. Utiliza la tecnología xMAP (con licencia de Luminex) que permite el análisis múltiple de hasta 500 ensayos diferentes de forma simultánea.

ESPECTRÓMETRO DE MASAS HÍBRIDO QUADRUPOLE-ORBITRAP Q-Exactive (Thermo Scientific). El espectrómetro de masas Q-Exactive LC-MS/MS combina la selección de precursores de alta eficacia del cuadrupolo con la detección de masa exacta (HR/AM) del detector de masas Orbitrap para la obtención de una extraordinaria precisión y tremenda versatilidad en la determinación de masas.

- Poder de resolución de hasta 140,000
- Máxima velocidad de escaneo 12Hz
- Rango dinámico de masas > 5000:1
- Filtro de masas con cuadrupolo

El equipo Q-Exactive LC-MS/MS no sólo ofrece una capacidad de *screening* muy elevada sino también excelentes valoraciones cuantitativas. El Sistema permite estudios metabolómicos, proteómicos, medioambientales, agroalimentarios, farmacológicos, toxicológicos y clínicos.

ANEXO

Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals (The ICMJE)

The ICMJE recommends that **authorship** be based on the following 4 criteria:

1. Substantial contributions to the conception or design of the work; or the acquisition, analysis, or interpretation of data for the work; AND
2. Drafting the work or revising it critically for important intellectual content; AND
3. Final approval of the version to be published; AND
4. Agreement to be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved.

In addition to being accountable for the parts of the work he or she has done, an author should be able to identify which co-authors are responsible for specific other parts of the work. In addition, authors should have confidence in the integrity of the contributions of their co-authors. All those designated as authors should meet all four criteria for authorship, and all who meet the four criteria should be identified as authors.

Those who do not meet all four criteria should be acknowledged—see Section below

Non-Author Contributors. Acknowledgement

Contributors who meet fewer than all 4 of the above criteria for authorship should not be listed as authors, but they should be **acknowledged**. Examples of activities that alone (without other contributions) do not qualify a contributor for authorship are acquisition of funding; general supervision of a research group or general administrative support; and writing assistance, technical editing, language editing, and proofreading. Those whose contributions do not justify authorship may be acknowledged individually or together as a group under a single heading (e.g. “Clinical Investigators” or “Participating Investigators”), and their contributions should be specified (e.g., “served as scientific advisors,” “critically reviewed the study proposal,” “collected data,” “provided and cared for study patients,” “participated in writing or technical editing of the manuscript”).