



SECRETARÍA DE SALUD

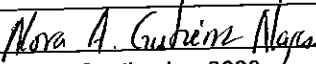


**MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS DE LA UNIDAD DE PROTEÓMICA
MÉDICA**

SEPTIEMBRE, 2008

INDICE

No.	Descripción	Hoja núm.
	Introducción	3
I.	Objetivo del Manual	5
II.	Marco Jurídico	6
III.	Procesos	15
	I. Procedimiento para la separación de proteínas para geles ID (SDS-PAGE) II. Procedimiento para separación de proteínas para geles ID (pI) a) Limpieza de muestra Método TCA/acetona b) Cuantificación (opcional) Método 2D Quant Kit c) Limpieza de muestra Método RC-DC Biorad d) Isoelectroenfoque III. Procedimiento para la separación de proteínas para geles 2D (pI SDS-PAGE) IV. Procedimiento para el marcaje molecular de proteínas por método de electroforesis diferencial en gel (DIGE) V. Procedimiento para la determinación de m/z de un péptido o una proteína VI. Procedimiento para identificación de proteínas por MALDI-TOF/TOF (Directa) VII. Procedimiento identificación de proteínas por MALDI-TOF/TOF (usando HPLC) VIII. Identificación de proteínas por MALDI-LTQ/Orbitrap (Directa) IX. Identificación de proteínas por Electrospray-LTQ/Orbitrap X. Digestión de proteínas a partir de gel XI. Desalación de péptidos utilizando Zip Tips	

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró :	Revisó :	Autorizó:
Nombre	Dra. Nora Gutiérrez Nájera	Dr. Santiago March Mifsut	Dr. Gerardo Jiménez Sánchez
Firma			
Fecha	Septiembre 2008	Septiembre 2008	Septiembre 2008

INTRODUCCIÓN

El presente manual integra los procedimientos técnicos necesarios para realizar las actividades asignadas a la Unidad de Proteómica Médica del Instituto Nacional de Medicina Genómica, del personal involucrado en la operación institucional de dicha Unidad.

La Unidad de Proteómica Médica tiene como objetivos el separar, identificar, caracterizar y cuantificar proteínas presentes en muestras relacionadas a diversas patologías basándose en el patrón de expresión diferencial entre muestras, las cuales pueden establecerse como biomarcadores de diagnóstico temprano, así como para la búsqueda de blancos terapéuticos susceptibles al desarrollo de fármacos para combatir enfermedades comunes y de gran impacto en la salud pública de los mexicanos.

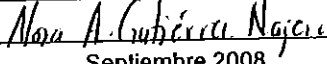
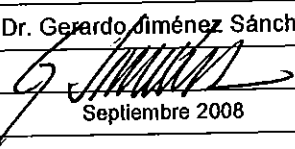
En Proteómica los procesos de estandarización asociados a los distintos flujos y técnicas de trabajo, así como al reporte de datos asociados a ellos suponen un reto importantísimo pero inconcluso. La comunidad proteómica en general sigue las recomendaciones, guías y formatos que emite HUPO-PSI (Human Proteome Organization- Proteomics Standards).

La Unidad de Proteómica Médica del Instituto cuenta con el siguiente equipo:

- Estación de trabajo Ettan spot
- Escaner DIGE Imager
- Sistema IPG phor III para la realización de electroforesis en primera dimensión
- Sistema para electroforesis de 12 geles grandes
- Sistema automatizado para la tinción de geles
- Escaner de tinciones visibles
- Espectrómetro de masas ESI/MALDI- LTQ/Orbitrap
- Espectrómetro de masas MALDI-TOF/ TOF
- Cromatógrafo de líquidos de alta resolución HPLC
- Unidad de Speed Vac
- Ultracentrífuga Optima MAX (130,000 rpm) con rotores TLA 100.3 Y MLA 80
- Ultracentrífuga Optima L-100 XP con rotores 45Ti y 70Ti
- Transiluminador de Luz blanca
- Procesador Ultrasónico marca Cole Parmer
- Espectrofotómetro UV/Visible
- Detector de microplacas
- Secador de geles
- Cromatógrafo HPLC Tempo/ MALDI

La Unidad de Proteómica Médica cuenta con los siguientes Recursos Humanos:

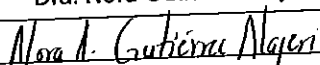
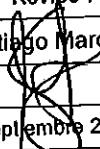
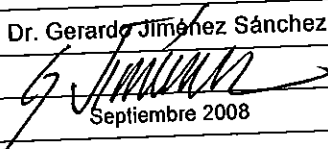
- 2 Investigadores en Ciencias Médicas "B"
- 1 Investigador en Ciencias Médicas "C"
- 2 Laboratoristas "B"

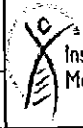
CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró :	Revisó :	Autorizó:
Nombre	Dra. Nora Gutiérrez Nájera	Dr. Santiago March Mifsut	Dr. Gerardo Jiménez Sánchez
Firma			
Fecha	Septiembre 2008	Septiembre 2008	Septiembre 2008

SALUD  SECRETARÍA DE SALUD	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN		 Instituto Nacional de Medicina Genómica MEXICO	Código:
	UNIDAD DE PROTEÓMICA MÉDICA			Rev.
				Hoja: 3 de 70

- 1 tesista de Licenciatura
- 4 alumnos de servicio social

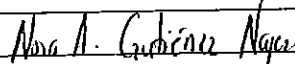
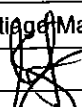
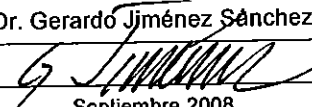
La actualización del presente manual estará a cargo de la Subdirección de Planeación, en coordinación con la Dirección de Investigación, que se encargará de su instrumentación, así como de su difusión a los responsables de las áreas y personal involucrado

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró :	Revisó :	Autorizó:
Nombre	Dra. Nora Gutiérrez Nájera	Dr. Santiago March Mifsut	Dr. Gerardo Jiménez Sánchez
Firma			
Fecha	Septiembre 2008	Septiembre 2008	Septiembre 2008

SALUD  SECRETARÍA DE SALUD	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN		 Instituto Nacional de Medicina Genómica MEXICO	Código:
	UNIDAD DE PROTEÓMICA MÉDICA			Rev.
				Hoja: 4 de 70

I. OBJETIVO

Contar con un documento en el que se describan las actividades propias de la Unidad de Proteómica Médica, que sirvan de guía o referencia al personal que labora en dicha área, y como inducción al personal del Instituto, estableciendo para tal efecto las políticas, mecanismos y lineamientos necesarios para que la operación se realice en estricto apego a la normatividad en la materia y coadyuvando al cumplimiento de los objetivos institucionales.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró :	Revisó :	Autorizó:
Nombre	Dra. Nora Gutiérrez Nájera	Dr. Santiago March Mifsut	Dr. Gerardo Jiménez Sánchez
Firma			
Fecha	Septiembre 2008	Septiembre 2008	Septiembre 2008

II. MARCO JURÍDICO

Constitución Política de los Estados Unidos Mexicanos

D.O.F. 05-II-1917 y sus reformas

Leyes

Ley de Planeación.

D. O. F. 05-I-1983 y sus reformas.

Ley Orgánica de la Administración Pública Federal.

D.O.F. 29-XII-1976 y sus reformas

Ley Federal de Entidades Paraestatales.

D.O.F. 14-V-1986 y sus reformas

Ley Federal de Presupuesto y Responsabilidad Hacendaria.

D.O.F. 30-III-2006 y sus reformas.

Ley Federal de Transparencia y Acceso a la Información Pública Gubernamental

D.O.F. 11-VII-1992 y sus reformas.

Ley Federal sobre Metrología y Normalización.

D.O.F. 01-VII-1992 y sus reformas

Ley General de Salud

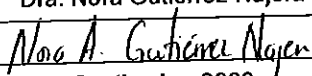
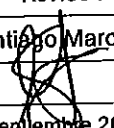
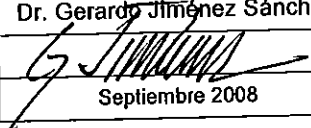
D.O.F. 07-II-1984 y sus reformas.

Ley General de Desarrollo Social

D.O.F. 20-I-2004.

Ley General de Protección Civil

D.O.F. 12-V-2000

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró :	Revisó :	Autorizó:
Nombre	Dra. Nora Gutiérrez Nájera	Dr. Santiago March Mifsut	Dr. Gerardo Jiménez Sánchez
Firma			
Fecha	Septiembre 2008	Septiembre 2008	Septiembre 2008

Ley General de las Personas con Discapacidad
 D.O.F. 10-VI-2005.

Ley de los Institutos Nacionales de Salud
 D.O.F. 26-V-200 y sus reformas.

Ley de Ciencia y Tecnología
 D.O.F. 5-VI-2002 y sus reformas

Ley de la Propiedad Industrial
 D.O.F. 27-VI-1991 y sus reformas

Ley de Fiscalización Superior de la Federación
 D.O.F. 29-XII-2000 y sus reformas

Ley de Ingresos de la Federación para el Ejercicio Fiscal 2008
 D.O.F. 13-XII-2007

Ley de Adquisiciones, Arrendamientos y Servicios del Sector Público.
 D.O.F. 04-I-2000 y sus reformas

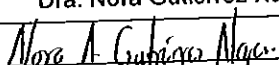
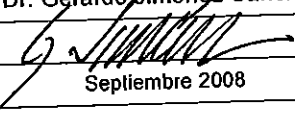
Códigos

Código Civil Federal.
 D. O. F. 28-VIII-2005.

Código Penal Federal.
 D.O.F. 14-VIII-1931 y sus reformas.

Código Federal de Procedimientos Civiles.
 D.O.F. 24-II-1943 y sus reformas.

Código Federal de Procedimientos Penales.
 D. O. F. 30-VIII-1934 y sus reformas.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró :	Revisó :	Autorizó:
Nombre	Dra. Nora Gutiérrez Nájera	Dr. Santiago March Mifsut	Dr. Gerardo Jiménez Sánchez
Firma			
Fecha	Septiembre 2008	Septiembre 2008	Septiembre 2008

Estatutos

Estatuto Orgánico del Instituto Nacional de Medicina Genómica.

IV Sesión Ordinaria de la Junta de Gobierno del INMEGEN 16-III-2007

Reglamentos

Reglamento de la Ley Federal de Entidades Paraestatales.
 D. O. F. 26-I-1990 y sus reformas.

Reglamento de la Ley Federal de Transparencia y Acceso a la Información Pública
 Gubernamental.
 D. O. F. 11-VI-2003.

Reglamento de la Ley Federal de Presupuesto y Responsabilidad Hacendaria
 D.O.F. 28-VI-2006 y sus reformas.

Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud.
 D.O.F. 06-I-1987.

Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Sanidad Internacional.
 D.O.F. 18-II-1985. Fe de erratas 10-VII-1985.
 D.O.F. 18-I-1988.

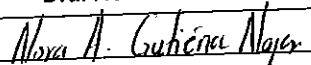
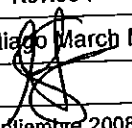
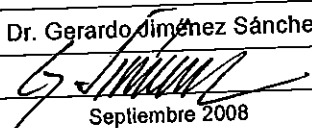
Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Protección Social en Salud.
 D.O.F. 05-IV-2004.

Reglamento Interior de la Comisión Interinstitucional de Investigación para la Salud.
 D.O.F. 10-VIII-1988.

Reglamento de la Ley de Presupuesto, Contabilidad y Gasto Público Federal.
 D.O.F. 18-XI-1981 y sus reformas.

Reglamento de la Ley de Adquisiciones, Arrendamientos y Servicios del Sector Público.
 D.O.F. 20-VIII-2001.

Reglamento de la Ley de la Propiedad Industrial
 D.O.F. 23-XI-1994 y sus reformas.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró :	Revisó :	Autorizó:
Nombre	Dra. Nora Gutiérrez Nájera	Dr. Santiago March Miljut	Dr. Gerardo Jiménez Sánchez
Firma			
Fecha	Septiembre 2008	Septiembre 2008	Septiembre 2008

SALUD  SECRETARÍA DE SALUD	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN		 Instituto Nacional de Medicina Genómica MÉXICO	Código:
	UNIDAD DE PROTEÓMICA MÉDICA			Rev.
				Hoja: 8 de 70

Reglamento Federal de Seguridad, Higiene y Medio Ambiente de Trabajo
D.O.F. 21-I-1997.

Reglamento de la Ley de Protección Civil para el Distrito Federal.
D. O. F. 21-X-1996.

Reglamento de Seguridad, Higiene y Medio Ambiente en el Trabajo del Sector Público Federal.
D.O.F. 29-IX-2006

Planes y Programas

Plan Nacional de Desarrollo 2007-2012.
D.O.F. 31-V-2007

Programa Sectorial de Salud 2007-20012
D.O.F. 14 de diciembre de 2007

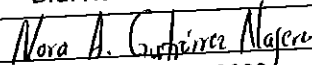
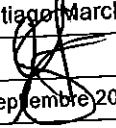
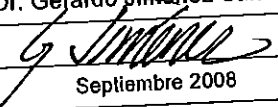
Decretos

Decreto por el que se adiciona una fracción V bis al artículo 5, y un artículo 7 bis al Capítulo I del Título Segundo de la Ley de los Institutos Nacionales de Salud.
D.O.F. 20-VII-2004.

Decreto por el que los titulares de las dependencias y entidades de la Administración Pública hasta el nivel de Director General en sector centralizado o su equivalente en el sector paraestatal, deberán rendir al separarse de sus empleos, cargos o comisiones, un informe de los asuntos de sus competencias y entregar los recursos financieros, humanos y materiales que tengan asignados para el ejercicio de sus atribuciones legales a quienes los sustituyan en sus funciones.
D.O.F. 02-IX-1988.

Decreto para realizar la entrega-recepción del Informe de los Asuntos a cargo de los Servidores Públicos y de los recursos que tengan asignados al momento de separarse de su empleo, cargo o comisión.
D. O. F. 14-IX-2005.

Decreto por el que se establecen diversas medidas en materia de adquisiciones, uso de papel y de la certificación de manejo sustentable de bosques de la Administración Pública Federal.
D.O.F. 05-IX-2007.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró :	Revisó :	Autorizó:
Nombre	Dra. Nora Gutiérrez Nájera	Dr. Santiago March Mifsut	Dr. Gerardo Jiménez Sánchez
Firma			
Fecha	Septiembre 2008	Septiembre 2008	Septiembre 2008

Decreto que establece las medidas de austeridad y disciplina del gasto de la Administración Pública Federal.
 D.O.F. 04-XII-2006.

Acuerdos del Ejecutivo

Acuerdo por el que se adicionan o modifican los Lineamientos Específicos para la Aplicación y Seguimiento de las medidas de austeridad y disciplina del gasto de la Administración Pública Federal.
 D.O.F. 14-V-2007

Acuerdo por el que se fijan criterios para la aplicación de la Ley Federal de Responsabilidades en lo referente a los familiares de los Servidores Públicos.
 D.O.F. 11-II-1983

Acuerdo por el que se crea la Comisión Interinstitucional de Investigación en Salud.
 D.O.F. 19-X-1983

Acuerdo por el que se establecen los lineamientos para la accesibilidad de las personas con discapacidad a inmuebles federales.
 D.O.F. 12-I-2004.

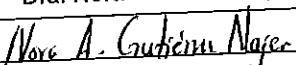
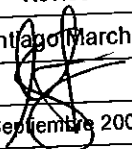
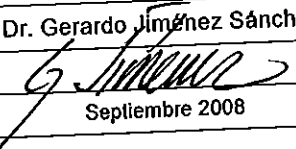
Normas Oficiales Mexicanas

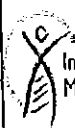
Norma Oficial Mexicana NOM-040-SSA2-2004, en materia de información en salud.
 D. O. F. 28-IX-2005.

Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002, Protección Ambiental-Salud Ambiental-Residuos peligrosos, biológicos-infecciosos. Clasificación y especificaciones de manejo.
 D. O. F. 17-II-2003.

Norma Oficial Mexicana NOM-166-SSA-1-1997, para la organización y funcionamiento de los laboratorios clínicos.
 D.O.F. 13-I-2000.

Norma Oficial mexicana NOM-178-SSA-1998, que establece los requisitos mínimos de infraestructura y equipamiento de establecimientos para la atención médica de pacientes ambulatorios.
 D.O.F. 29-X-1999

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró :	Revisó :	Autorizó:
Nombre	Dra. Nora Gutiérrez Nájera	Dr. Santiago March Mifsut	Dr. Gerardo Jiménez Sánchez
Firma			
Fecha	Septiembre 2008	Septiembre 2008	Septiembre 2008

SALUD SECRETARÍA DE SALUD		MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS	 Instituto Nacional de Medicina Genómica MEXICO	Código:
		DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN		Rev.
		UNIDAD DE PROTEÓMICA MÉDICA		Hoja: 10 de 70

Norma Oficial Mexicana requisitos sanitarios del equipo de protección personal.
D.O.F. 28-IX-2005.

Proyectos de disposiciones jurídicas

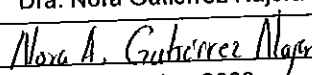
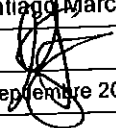
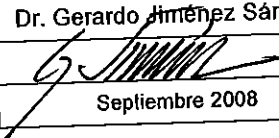
Decreto que adiciona la Ley General de Salud, referente al Genoma Humano.

Otros ordenamientos jurídicos

Códigos de Ética y de conducta del Instituto Nacional de Medicina Genómica
II Sesión Ordinaria de la Junta de Gobierno del Instituto Nacional de Medicina Genómica.
16-III-2006.

Lineamientos específicos para la aplicación y seguimiento de las medidas de austeridad y disciplina del gasto de la Administración Pública Federal.
D.O.F. 29-XII-2006.

Oficio Circular por el que se da a conocer el Código de Ética de los servidores Públicos de la Administración Pública Federal.
D.O.F. 31-VII-2002.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró :	Revisó :	Autorizó:
Nombre	Dra. Nora Gutiérrez Nájera	Dr. Santiago March Mifsut	Dr. Gerardo Jiménez Sánchez
Firma			
Fecha	Septiembre 2008	Septiembre 2008	Septiembre 2008

SALUD SECRETARÍA DE SALUD		MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN	 Instituto Nacional de Medicina Genómica MEXICO	Código:
				Rev.
		UNIDAD DE PROTEÓMICA MÉDICA		Hoja: 11 de 70

1. Propósito

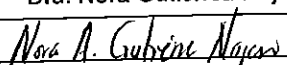
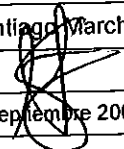
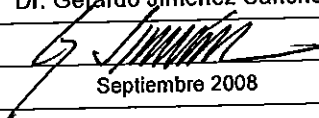
- 1.1 Describir los pasos y la secuencia a seguir para el procesamiento de muestras y entrega de resultados, utilizando la técnica de separación de proteínas en geles en dos dimensiones y la identificación de proteínas por espectrometría de masas en la Unidad de Proteómica Médica del Instituto Nacional de Medicina Genómica, que sirva de guía tanto para el personal que labora en el Instituto, como para el usuario del servicio.

2. Alcance

- 2.1 A nivel externo el ámbito de acción de este procedimiento es con las Instituciones afiliadas que desarrollen investigación científica aplicada a la medicina genómica o de áreas afines, tanto públicas como privadas.
- 2.2 A nivel interno el ámbito de acción es con el personal adscrito a las Direcciones de: Investigación y Desarrollo Tecnológico.

3. Políticas de operación, normas y lineamientos

- 3.1 La Dirección de Investigación es la única facultada para la adecuación y emisión de los pasos y secuencia a seguir para el procesamiento de recepción y entrega de muestras en la Unidad de Proteómica Médica;
- 3.2 La Unidad de Proteómica Médica requiere de la aprobación de la Dirección de Investigación, para la recepción de cualquier muestra así como para su procesamiento;
- 3.3 No se permite la entrada a personas ajenas a la Unidad de Proteómica Médica, excepto para entrega de muestras
- 3.4 Las muestras se entregarán al responsable de la Unidad. Se requiere que las muestras de proteína se entreguen bajo condiciones que protejan la integridad de las proteínas; en frío (hielo o hielo seco) y con inhibidores de la acción de proteasas. Cualquier otra muestra debe de entregarse conforme a lo pactado con el responsable de la Unidad durante la plática previa (ver 3.7);
- 3.5 La recepción de muestras será de lunes a viernes de 9:00 a 13:00 hrs. y de 16:00 a 18:00 hrs;
- 3.6 Toda solicitud externa para procesamiento de muestras deberá estar acompañada por la orden de pago efectuado en la caja del INMEGEN, con excepción de las que formen parte de un convenio de colaboración y el pago puede diferirse;
- 3.7 Las muestras deberán cumplir los estándares que se detallan a continuación: puntos (3.7, 3.8, 3.9) No se procesará ninguna muestra que no cumpla con los estándares mínimos;

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró :	Revisó :	Autorizó:
Nombre	Dra. Nora Gutiérrez Nájera	Dr. Santiago March Míslut	Dr. Gerardo Jiménez Sánchez
Firma			
Fecha	Septiembre 2008	Septiembre 2008	Septiembre 2008

- 3.8 El usuario tendrá una plática con el responsable de la Unidad de Proteómica y el personal técnico que él designe para definir la cantidad de muestra de proteína a entregar así como las condiciones de procesamiento de la muestra;
- 3.9 En caso de que la muestra sea proteína, ésta debe ser de la mejor calidad posible, no debe estar contaminada con DNA, RNA, lípidos iónicos o sales, ni debe presentar degradación pues esto es esencial para tener éxito en el procesamiento y análisis;
- 3.10 Las muestras deben entregarse con un valor de concentración de proteína de preferencia igual o mayor a ($1\mu\text{g}/\mu\text{L}$) Se recomienda realizar la cuantificación con los paquetes de cuantificación 2D-Quant (General Electric Healthcare) y RC DC Protein Assay (Bio-Rad);
- 3.11 Los resultados de los procesos solicitados se entregarán en el periodo que se establezca en la reunión previa a la entrega de la muestra;
- 3.12 Los datos que se obtengan del trabajo de procesamiento y análisis de las muestras así como resultados se mantendrán bajo resguardo único de la Unidad de Proteómica Médica del INMEGEN en bitácoras;
- 3.13 Las Bitácoras que se utilizan en la Unidad, son cuatro tipos: Bitácoras de muestra; bitácoras por investigador responsable del proyecto; bitácora para cada técnico y bitácoras de uso de equipos;
- 3.14 Se realizará un registro en la bitácora de muestras que se ingresan donde se define el número y tipo de muestra así como el número de folio asignado internamente en el Unidad;
- 3.15 Las bitácoras se llevarán por investigador responsable de proyecto, registrándose en ella todo lo relacionado a los proyectos bajo su responsabilidad. Esta bitácora abarcará todos los experimentos que se realcen en la Unidad de Proteómica (separaciones, espectrometría de masas, validación, etc.);
- 3.16 Cada técnico adscrito a la Unidad de Proteómica Médica, tendrá su propia bitácora donde anotará estandarizaciones y procesos o proyectos piloto, tanto externos como internos;
- 3.17 Las bitácoras pertenecen a la Unidad de Proteómica Médica del Instituto y sólo podrán ser consultadas por los investigadores responsables del proyecto y por el personal de Proteómica, guardando en cada momento la confidencialidad de cada uno de los proyectos de los diferentes usuarios. La consulta deberá realizarse dentro del área de la Unidad de Proteómica Médica;
- 3.18 Las bitácoras podrán ser consultadas por otro personal que no sea el investigador responsable, sólo con el consentimiento de este último;

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró :	Revisó :	Autorizó:
Nombre	Dra. Nora Gutiérrez Nájera	Dr. Santiago March Mifsut	Dr. Gerardo Jiménez Sánchez
Firma	<i>Nora H. Gutiérrez Nájera</i>	<i>[Firma]</i>	<i>[Firma]</i>
Fecha	Septiembre 2008	Septiembre 2008	Septiembre 2008

3.19 El equipo deberá ser utilizado únicamente por el personal adscrito a la Unidad de Proteómica Médica, o por el personal calificado y autorizado por el Responsable de la Unidad, pudiendo ser: técnicos, estudiantes de estancia, servicio social o tesis, asignados a la Unidad de Proteómica Médica;

3.20 Es estrictamente necesario anotar los datos solicitados en las bitácoras de uso del equipo, correspondientes, de otra forma no se permite el uso del equipo;

3.21 Los equipos que para su uso cuentan con bitácora son los siguientes;

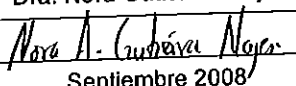
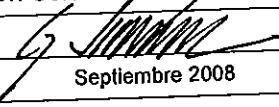
- Ettan spot handing Workstation
- Sistema IPG phor III
- Escáner de tinciones visibles, Image Scanner
- Escáner para tinciones fluorescentes y CyDyes Ettan DIGE Imager
- Centrífuga Allegra
- Ultracentrífuga Optima L-100 Xp
- Ultracentrífuga Optima Max
- Estación de trabajo HP con software DECyDer para análisis de geles
- Detector de microplacas DTX 800
- Balanza analítica
- Speed vac (centrífuga con vacío)
- Cromatógrafo de líquidos de alta resolución
- Espectrómetros de masas
- En el caso de centrífugas además de los datos antes descritos se anotan las revoluciones por minuto, en el caso del IPG phor III en pH y el número de tiras que se utilizan;

3.22 Los resultados se entregarán al usuario tanto interno como externo en un disco o impresión, el cual contendrá archivos de las imágenes obtenidas de los geles de poliacrilamida, inmunoblots, etc., archivos del análisis de imágenes y de los correspondientes análisis por cromatografías y espectros de masas;

3.23 En caso de detectar algún desperfecto o mal funcionamiento de cualquiera de los equipos se debe notificar inmediatamente al responsable de la Unidad;

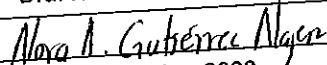
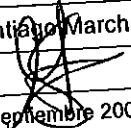
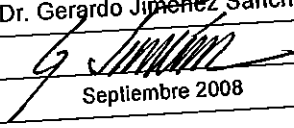
3.24 Los congeladores, refrigeradores y ultracongeladores, son para uso exclusivo del personal de la Unidad, no se permite almacenar muestras o reactivos ajenos a los proyectos autorizados que se estén desarrollando en la Unidad;

3.25 En todo el proceso el usuario no tendrá acceso a discusión de las condiciones de procesamiento dentro de la Unidad, salvo en la reunión previa a la entrega de la muestra y en

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró :	Revisó :	Autorizó:
Nombre	Dra. Nora Gutiérrez Nájera	Dr. Santiago March Mifsut	Dr. Gerardo Jiménez Sánchez
Firma			
Fecha	Septiembre 2008	Septiembre 2008	Septiembre 2008

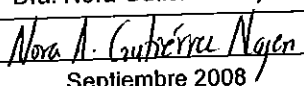
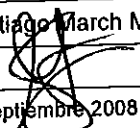
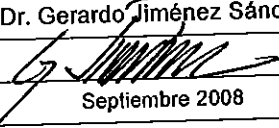
el caso de que el responsable del procesamiento solicite al responsable de la Unidad una reunión debido a que se requiera de información o autorización del usuario para continuar el procesamiento.

- 3.26 No se devolverá la muestra después de que ingresó a la Unidad para su procesamiento, a menos que no se haya comenzado su procesamiento;
- 3.27 Los resultados se guardarán en un archivo DVD durante 6 meses, después de ese tiempo se eliminan.
- 3.28 El personal generador de residuos debe identificarlos y separarlos según su tipo y clasificación según la Norma Oficial NOM 087 ECOL-SSA12002;
- 3.29 Durante la manipulación de material químico o biológico siempre debe portar el equipo de protección adecuado (guantes, cubrebocas y lentes de seguridad);
- 3.30 Es obligación de cada laboratorio que genere residuos y maneje reactivos químicos, tenga a la mano las hojas de seguridad de productos químicos que tiene en su área;
- 3.31 Los residuos generados se recolectarán por el personal de la empresa contratada para este fin;
- 3.32 Cuando se procesan muestras biológico infecciosas como las provenientes de fluidos corporales: (sangre, plasma, suero, orina, saliva, líquido cefalorraquídeo, entre otros), tiene que notificar al personal del área, y será responsable de mantener el equipo libre de contaminación que pueda poner en riesgo la salud del equipo científico de la Unidad;
- 3.33 El uso de bata es indispensable
- 3.34 Por seguridad, en caso de visitas guiadas a la Unidad de Proteómica Médica, no se permite que manipulen ningún equipo sin autorización del responsable además los visitantes deberán portar gafete y bata;

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró :	Revisó :	Autorizó:
Nombre	Dra. Nora Gutiérrez Nájera	Dr. Santiago March Mifsut	Dr. Gerardo Jiménez Sánchez
Firma			
Fecha	Septiembre 2008	Septiembre 2008	Septiembre 2008

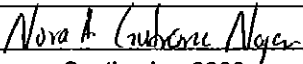
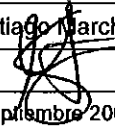
SALUD SECRETARÍA DE SALUD		MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN	 Instituto Nacional de Medicina Genómica MEXICO	Código:
		UNIDAD DE PROTEÓMICA MÉDICA		Rev.
		Hoja: 15 de 70		

III. PROCESOS TÉCNICOS DE LA UNIDAD DE PROTEÓMICA MÉDICA

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró :	Revisó :	Autorizó:
Nombre	Dra. Nora Gutiérrez Nájera	Dr. Santiago March Mifsut	Dr. Gerardo Jiménez Sánchez
Firma			
Fecha	Septiembre 2008	Septiembre 2008	Septiembre 2008

SALUD  SECRETARÍA DE SALUD	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN		 Instituto Nacional de Medicina Genómica MEXICO	Código:
	UNIDAD DE PROTEÓMICA MÉDICA			Rev.
				Hoja: 16 de 70

I. Procedimiento para la separación de proteínas para geles ID (SDS-PAGE)

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró :	Revisó :	Autorizó:
Nombre	Dra. Nora Gutiérrez Nájera	Dr. Santiago March Mílsul	Dr. Gerardo Jiménez Sánchez
Firma			
Fecha	Septiembre 2008	Septiembre 2008	Septiembre 2008

1.1 Descripción del Procedimiento. Separación de proteínas para geles ID (SDS-PAGE)

1. Preparación de la muestra

- 1.1 Se mide el volumen de muestra necesario para tener de 15-30 microgramos de la proteína.
- 1.2 En un tubo de microcentrifuga de 1.5 mL se añade buffer de la muestra (Tris 0.5 M, SDS 10%, β -mercaptoetanol 5%, urea 8 M, azul de bromofenol 0.01%) en volumen 1:1 con respecto al volumen de la muestra.

2. Preparación de geles

- 2.1 El gel consta de los geles separador y concentrador
- 2.2 Las cantidades y reactivos utilizados para cada uno se muestran en la tabla.

Reactivos	Gel Separador (μ L)	Gel concentrador (μ L)
Acrilamida-Bis-acrilamida (30% - 0.8%)	1166 μ L	227 μ L
Amortiguador del gel TRIS pH 8.8	875 μ L	425 μ L
SDS 10%	35 μ L	17 μ L
H ₂ O destilada	1407 μ L	1021.5 μ L
Persulfato de amonio 10%*	35.0 μ L	8.5 μ L
TEMED*	3.0 μ L	1 μ L
Cantidad total μ L	3501.66 μ L	1700 μ L

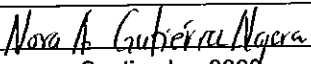
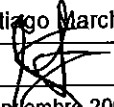
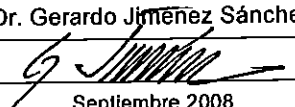
- 2.3 Se limpia perfectamente con alcohol las placas de vidrio y se montan sobre el cassette de acrílico para la preparación del gel. Se acomodan en el soporte de presión.

- 2.4 Se llena el espacio entre las dos placas de vidrio con agua y se va añadiendo con una pipeta pasteur para asegurarnos de que el líquido no se salga por la parte inferior de las placas. Después de esto se vacía el agua en la tarja inclinando el soporte con los dos cassettes, o volteando el sistema totalmente. Si no sella adecuadamente se puede usar vaselina o pedazos de parafilm para ajustar el soporte.

- 2.5 Si no se queda completamente desalojado el líquido del espacio con la punta de una toalla de papel absorbente se quitan las gotitas de las orillas superiores, o sino se limpia con una toalla de papel para secar las manos. Hasta observar que los residuos de agua sean mínimos.

Nota: La manipulación de acrilamida se debe hacer con guantes

CONTROL DE EMISIÓN

	Elaboró :	Revisó :	Autorizó:
Nombre	Dra. Nora Gutiérrez Nájera	Dr. Santiago March Mifsut	Dr. Gerardo Jiménez Sánchez
Firma			
Fecha	Septiembre 2008	Septiembre 2008	Septiembre 2008

2.6	Se preparan vasitos de nalgene con etiquetas de gel separador y gel concentrador adicionalmente las cantidades que se presentan en la preparación.
2.7	Se debe tener cuidado para adicionar los agentes polimerizantes como el persulfato y el TEMED ya que el orden es estricto como se observa en la tabla.
2.8	Se agita cuidadosamente cuando se añadan cada uno de los reactivos para el gel separador y concentrador se agregan solamente hasta el agua y SOLAMENTE HASTA QUE SE VAYA A VACIAR EN LAS PLACAS DE VIDRIO SE AÑADEN EL PERSULFATO DE AMONIO AL 10% Y EL TEMED.
2.9	Se añade inmediatamente la mezcla anterior con pipeta pasteur al espacio entre las dos placas de vidrio. Se nivela el soporte donde están ensambladas las placas de vidrio, para esto se usa la burbuja. Con esto se evita que haya inclinación en el gel.
2.10	Añadimos posteriormente agua bidestilada o SDS al 0.1% o n-butanol saturado con agua para evitar la formación del borde cóncavo al gelificar (polimerizar) la acrilamida.
2.11	Dejamos polimerizar entre 0.5-1hr. Después de esto terminamos de añadir el persulfato y el TEMED para el gel concentrador agitamos. Decantamos el SDS 0.1% que estaba sobre el gel separador (cuando ya este gelificado se observa claramente la división entre el SDS y el gel.
2.12	Agregamos la mezcla para el gel concentrador y se inserta inmediatamente el peine de plástico para formar los pozos para las muestras. Se deja polimerizar también por 0.5-1 hr.
3. Electroforesis SDS-PAGE	
3.1	Se comienzan a preparar las muestras (ver inciso 1.1)
3.2	Se llena la cámara con agua para observar si no se sale por alguna fuga el buffer
3.3	El buffer del cátodo se vació en el interior de la cámara de los geles.
3.4	Se corrieron los geles a 30V con la fuente de poder a toda la corriente hasta que llegó al gel separador. Cuando llegron al gel separador se aumentó a 90-150V y a toda corriente.
3.5	Se dejó que siguiera corriendo el gel hasta que casi se salió todo el colorante de las muestras.
3.6	Una vez terminada la electroforesis, se separan las placas de vidrio con un cuchillo plano sin filo (la manipulación del gel debe hacerse con guantes, haciendo efecto de palanca). Se corta el gel concentrador con el cuchillo plano.
3.7	Posteriormente se moja con agua el gel para que se desprenda más rápidamente de entre las placas y entonces se toma de la parte inferior del gel con los dedos sujetando los dos extremos y se pasa a la tinción.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró :	Revisó :	Autorizó:
Nombre	Dra. Nora Gutiérrez Nájera	Dr. Santiago March Mifsut	Dr. Gerardo Jiménez Sánchez
Firma	<i>Nora A. Gutiérrez Nájera</i>	<i>[Firma]</i>	<i>[Firma]</i>
Fecha	Septiembre 2008	Septiembre 2008	Septiembre 2008

4. Tinción

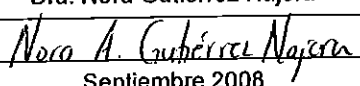
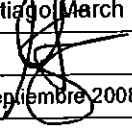
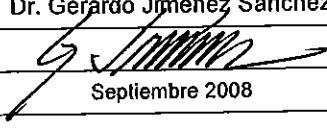
- 4.1 Se coloca el gel que sale de la electroforesis en solución teñidora (metanol 50%, ácido acético 10% y azul de coomassie al 0.2%) se deja toda la noche.
- 4.2 Al día siguiente se decanta la solución teñidora y se enjuaga el exceso de solución teñidora con 3 lavados de agua miliQ.
- 4.3 Después de los lavados se añade solución destañidora (etanol 50%, ácido acético 10%)
- 4.4 Se va cambiando la solución destañidora cuando se sature de colorante de coomassie hasta que las manchas de proteína se hagan visibles.
- 4.5 Se añade solución fijadora (ácido acético al 10%)

5. Escaneo del gel

- 5.1 Se seleccionan los parámetros para el escaner. (software LabScan GE Healthcare) Seleccionar en el menú principal *Edit > Settings*.
- 5.2 Ajustar los parámetros bajo Scanning en *mode > transparent*
- 5.3 Si es necesario calibrar (al menos una vez al mes) se realizan los siguientes pasos:
 - Se coloca la tableta provista por el fabricante contra el vidrio del escaner
 - Se debe colocar en posición vertical en la posición cero del escáner con el extremo claro contra el borde del escáner y el lado brillante de la tableta contra el vidrio.
 - Se selecciona el menú *calibration > calibrate*
 - Aparece una ventana pidiendo que se ajuste de acuerdo a la escala de grises se cierra la ventana de la curva de calibración.
 - El software pregunta si se desea guardar la calibración creada seleccionar *yes*
- 5.4 Se oprime el icono de *Preview* en la barra de herramientas para obtener una vista previa del gel.
- 5.5 Se despliega una ventana que pide que se coloque el gel sobre el vidrio del escáner.
- 5.6 Se coloca el gel sobre el vidrio del escáner centrándolo en la posición cero del escáner.
- 5.7 Se selecciona *OK*
- 5.8 Si se tiene que ajustar el área de escaneo de la imagen previa se oprime el icono de *Region tool* y se ajusta el área delimitada por una línea punteada roja.
- 5.9 Se oprime el icono de *Scan* para obtener la imagen final deseada.

6. Análisis de la imagen del gel (Software ImageQuant)

- 6.1 Dar doble click en el icono de Image Quant en el escritorio.
- 6.2 Seleccionar la opción "ID gel análisis" Buscar y abrir el gel que se requiera analizar, debe tener la terminación "tif", "tiff", "gel" o "ds".

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró :	Revisó :	Autorizó:
Nombre	Dra. Nora Gutiérrez Nájera	Dr. Santiago March Mifsut	Dr. Gerardo Jiménez Sánchez
Firma			
Fecha	Septiembre 2008	Septiembre 2008	Septiembre 2008

6.3 Seleccionar la forma de análisis, ya sea automático o manual.

6.4 Elegir la opción *Stepwise*, aparecerá la barra de creación de columnas. Dar click sobre el icono *Automatic* y después en *Accept*.

6.5 Si se elige el modo Manual, en la sección de parámetros se puede seleccionar el número de columnas o *Lanes*, axial como los espacios en los que se pueden hacer columnas o *Tiers* y la distancia entre columnas con *Lane % width*. Para generar las columnas, dar click derecho en un extremo y arrastrar el mouse hasta que las líneas coincidan con las columnas del gel. Dar click en *Accept* para que en la ventana de *Lanes* aparezca la gráfica correspondiente.

6.6 Dar clic en la flecha *next* para ir al siguiente paso.

6.7 En la barra de parámetros, seleccionar el método para quitar el fondo y después hacer click en el botón *subtract*. Dar clic en la flecha *next*.

6.8 Seleccionar los parámetros deseados, axial como el *minimum slope* y dar click en el *Detect* para detectar las bandas.

6.9 Para ampliar o reducir el tamaño de una banda colocar el cursor sobre la línea punteada en la imagen horizontal del gel hasta que aparezca una flecha de dos puntas, dar click izquierdo y arrastrar hasta ajustar la dimensión.

6.10 Para agregar un marcador de peso molecular, seleccionar el tipo de marcador o *Standar*, si no existe se puede crear uno nuevo haciendo clic *Edit* y después en *Edit/ create*, en la ventana *Edit Standard*.

6.11 En la imagen del gel seleccionar la columna correspondiente al marcador de peso molecular. Dar click en el rombo correspondiente a la primera banda y dar click en *Compute*.

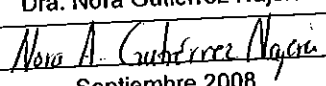
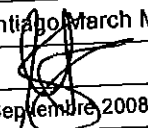
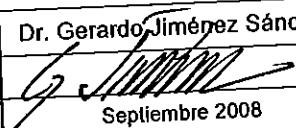
6.12 Dar click en *next* para hacer la curva de calibración, dar click en la banda correspondiente a la curva y anotar sus valores. Las unidades se pueden cambiar en la barra de parámetros.

6.13 Dar clic en *Calibrate*, en la ventana inferior aparecen los valores de cada banda de la columna seleccionada.

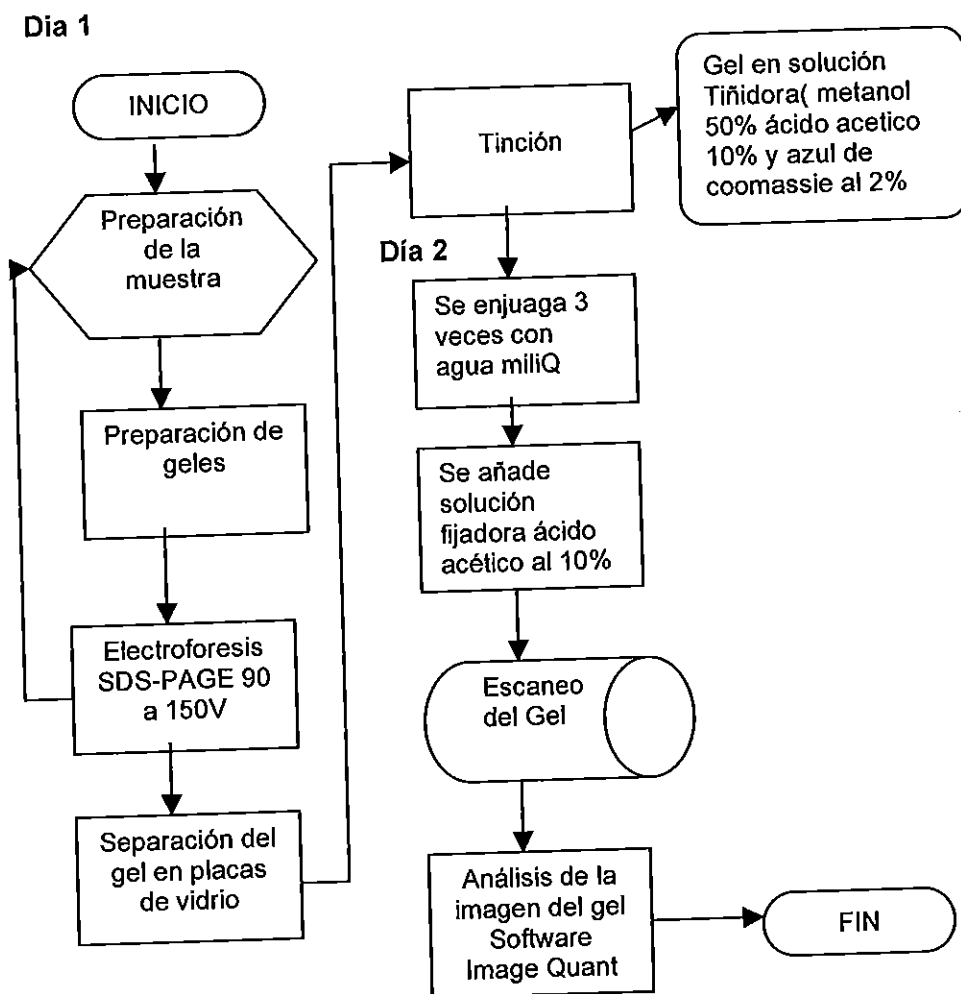
6.14 Para señalar bandas de interés sobre el gel, dar click en *Annotate* y después dar click en la región donde se quiera hacer un señalamiento.

6.15 Para guardar los datos de tablas, hacer click sobre la ventana de *Measurements*, después dar click en *Edit* en la barra superior y después en *Export to Excel* o *Export to file*.

TERMINA PROCEDIMIENTO

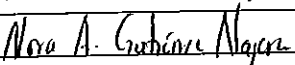
CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró :	Revisó :	Autorizó:
Nombre	Dra. Nora Gutiérrez Nájera	Dr. Santiago March Mifsut	Dr. Gerardo Jiménez Sánchez
Firma			
Fecha	Septiembre 2008	Septiembre 2008	Septiembre 2008

1.2 Diagrama de flujo del Procedimiento para la separación de proteínas para geles ID (SDS-PAGE)



CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró :	Revisó :	Autorizó:
Nombre	Dra. Nora Gutiérrez Nájera	Dr. Santiago March Mifsut	Dr. Gerardo Jiménez Sánchez
Firma	<i>Nora A. Gutiérrez Nájera</i>	<i>[Firma]</i>	<i>[Firma]</i>
Fecha	Septiembre 2008	Septiembre 2008	Septiembre 2008

II. Procedimiento para separación de proteínas para geles ID (pl)

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró :	Revisó :	Autorizó:
Nombre	Dra. Nora Gutiérrez Nájera	Dr. Santiago March Mifsut	Dr. Gerardo Jiménez Sánchez
Firma			
Fecha	Septiembre 2008	Septiembre 2008	Septiembre 2008

II. A) Descripción del Procedimiento para Limpieza de muestra . Método TCA/acetona

1. La muestra de proteínas se lleva a 900µL con agua mQ.
2. Se agregan 100µL de TCA al 77% en acetona fría. Se mezcla lentamente
3. La mezcla se incuba a -20 °C durante 30 minutos
4. Centrifugar las muestras a 15000x g durante 15 min. a 4°C Descartar el sobrenadante
5. Lavar 3 veces con 400µL de acetona fría.
6. Secar a temperatura ambiente. Dejar destapados los tubos
7. Las pastillas de proteína se resuspenden en aproximadamente 150µL de amortiguador de hidratación.
8. Las proteínas se almacenan a -20° C hasta su uso.
TERMINA PROCEDIMIENTO

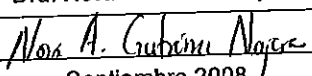
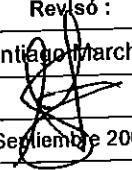
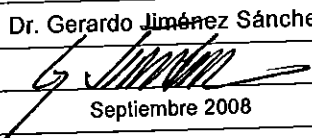
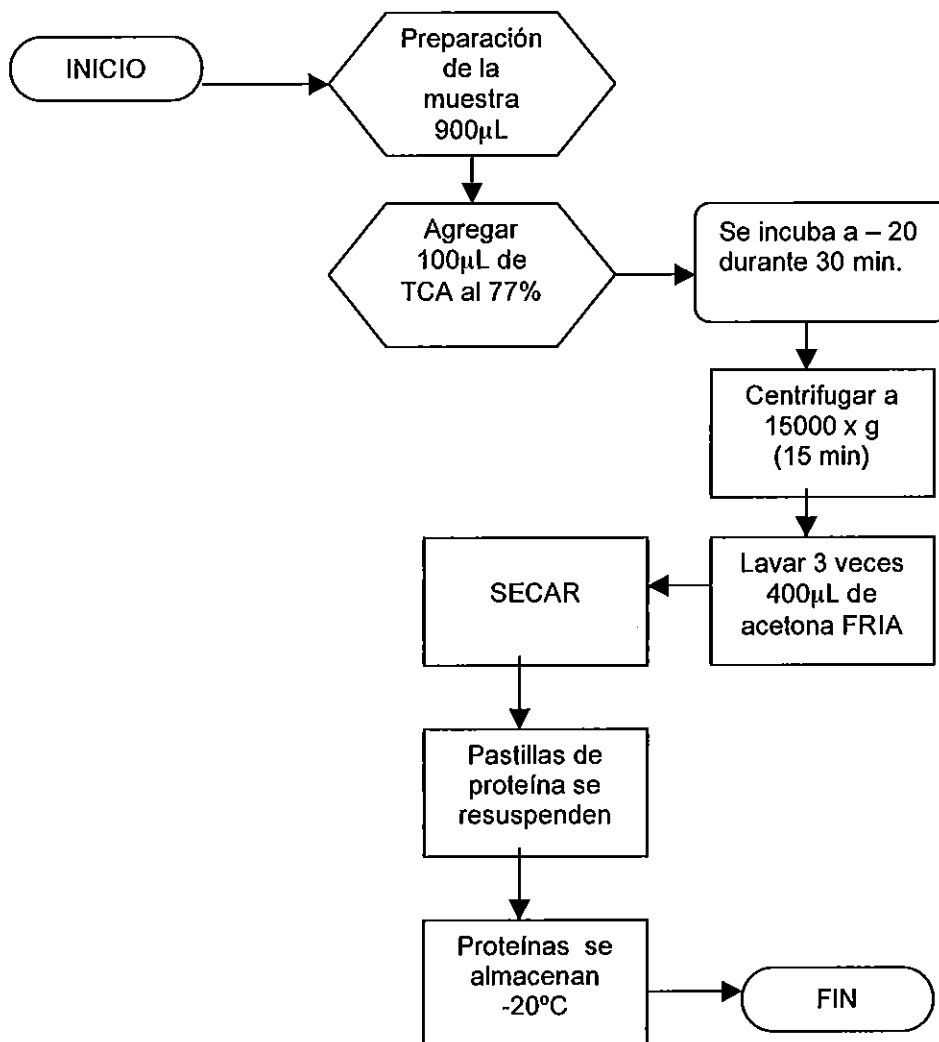
CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró :	Revisó :	Autorizó:
Nombre	Dra. Nora Gutiérrez Nájera	Dr. Santiago March Mifsut	Dr. Gerardo Jiménez Sánchez
Firma			
Fecha	Septiembre 2008	Septiembre 2008	Septiembre 2008

Diagrama de Flujo. Procedimiento Limpieza de la muestra con el Método TCA/acetona



CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró :	Revisó :	Autorizó:
Nombre	Dra. Nora Gutiérrez Nájera	Dr. Santiago March Mifsut	Dr. Gerardo Jiménez Sánchez
Firma	<i>Nora A. Gutiérrez Nájera</i>	<i>[Signature]</i>	<i>[Signature]</i>
Fecha	Septiembre 2008	Septiembre 2008	Septiembre 2008

II. B) Descripción del Procedimiento de cuantificación (opcional) Método 2D Quant Kit

1. Antes de iniciar el ensayo, leer la microplaca vacía en el lector y determinar las absorbancias de todos los pozos. Estas deben restar a las absorbancias registradas en cada pozo obtenidas en el punto (13).	
2. Preparar en la microplaca una curva estándar utilizando BSA 2mg/ml, entre 0-20µg de proteína.	
3. Colocar en un pozo bien identificado 1-3µL de la muestra. Realizar esto por triplicado.	
4. Adicionar 75µL de precipitante a cada pozo (incluyendo los de la curva).	
5. Agregar 75µL de Co-precipitante a cada pozo	
6. Centrifugar la microplaca a 5700xg durante 20min. a 4°C	
7. Remover cuidadosamente el sobrenadante con una micropipeta tan pronto como sea posible para evitar la resuspensión de las proteínas.	
8. Agregar 15µL de solución de cobre y 60µL de agua destilada a cada pozo.	
9. Resuspender en un termomezclador durante 20min. a 500rpm y 37°C Si después de este tiempo queda precipitado en el fondo de algún pozo, promover su resuspensión utilizando un pincel.	
10. Agregar 150µL del reactivo de color. Provocar el mezclado adicionando el reactivo rápidamente al pozo.	
11. Mezclar 20 segundos en un mezclador	
12. Incubar a temperatura ambiente durante 15-20 minutos. La absorbancia no se debe leer a más de 40 minutos luego de adicionado el reactivo de color.	
13. Leer la absorbancia de los pozos a 450nm en el lector de microplacas, Restar la absorbancia de la placa a cada pozo.	
TERMINA PROCEDIMIENTO	

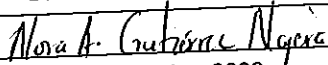
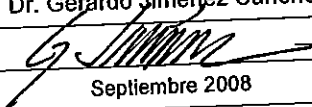
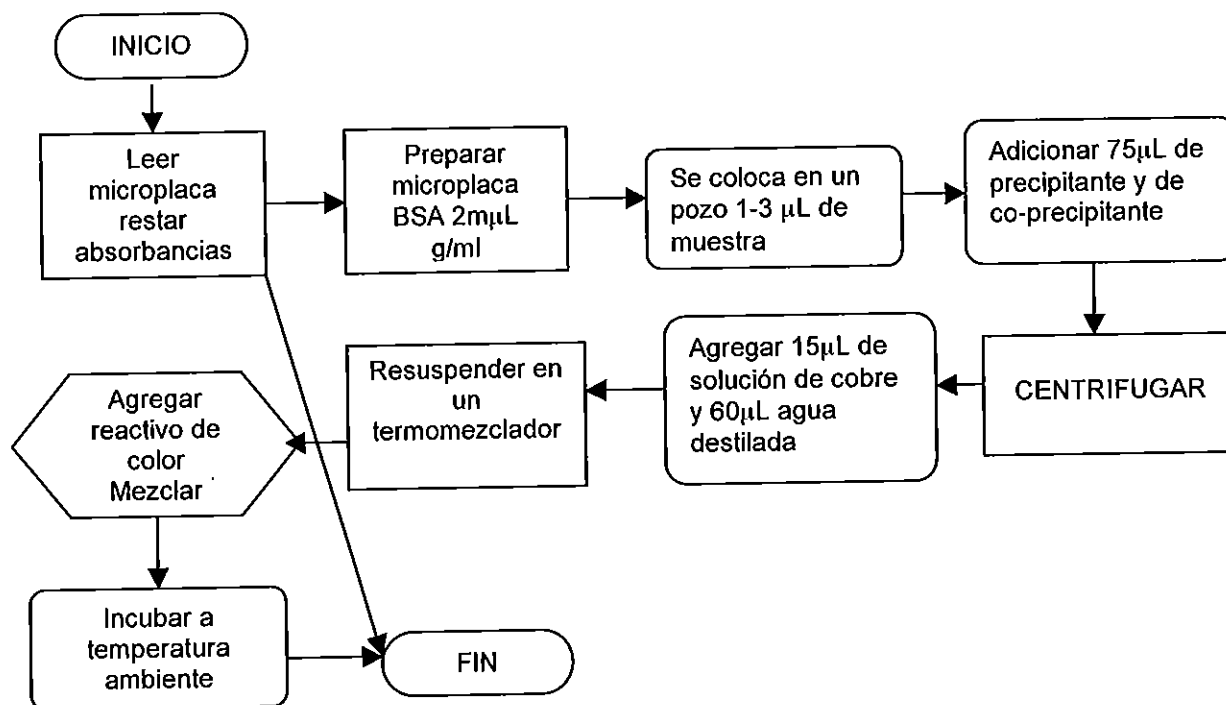
CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró :	Revisó :	Autorizó:
Nombre	Dra. Nora Gutiérrez Nájera	Dr. Santiago March Mifsut	Dr. Gerardo Jiménez Sánchez
Firma			
Fecha	Septiembre 2008	Septiembre 2008	Septiembre 2008

Diagrama de Flujo. Método 2D Quant Kit



CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró :	Revisó :	Autorizó:
Nombre	Dra. Nora Gutiérrez Nájera	Dr. Santiago March Mifsut	Dr. Gerardo Jiménez Sánchez
Firma	<i>Nora A. Gutiérrez Nájera</i>	<i>[Signature]</i>	<i>[Signature]</i>
Fecha	Septiembre 2008	Septiembre 2008	Septiembre 2008

II. C) Descripción del Procedimiento de cuantificación Método RC-DC Biorad

1. Preparación del Reactivo de trabajo A
a) Adicionara 20µL del Reactivo S por cada 1 mL de Reactivo A que será utilizado para la determinación. Cada pozo requiere 25µL de este reactivo. (El Reactivo de trabajo A' es estable por una semana aún cuando se forme un precipitado luego de un día. Si se forma dicho precipitado, caliente la solución a 38°C durante 5min. y mezcle en vortex. No pipetee para tratar de disolver, ya que puede taparse la punta y alterar el volumen de reactivo que es adicionado a la muestra)
b) Si las muestras no contienen detergente, puede omitir el paso 9 y utilizar el reactivo A tal cual.
2. Antes de iniciar el ensayo, leer la microplaca vacía en el lector y determinar las absorbancias, de todos los pozos. Estas se deben restar a las absorbancias registradas en cada pozo obtenidas en el punto 10.
3. Preparar 5-10 puntos de estándar de proteína que contengan de 5 hasta 30µg de proteína. Se debe preparar la curva de calibración por cada ensayo que se realice.
4. Pipetear de 1-3µL muestras en cada microplaca limpia y seca
a) Si se sospecha que el medio puede interferir con la cuantificación, se puede llevar a cabo un paso extra de precipitación. De lo contrario proseguir con el punto 5
b) Agregar 25mL de reactivo I
c) Agregar 25mL de reactivo II
d) Centrifugar a 15000g por 10min.
e) Remover cuidadosamente el sobrenadante
5. Adicionar 25µL del Reactivo de trabajo A' a cada pozo
6. Adicionar 200µL del Reactivo B a cada pozo
7. Agitar durante 20 segundos en un mezclador
8. Colocar la placa en el lector de microplaca. Si el lector de microplaca tiene función de mezclado, agitar la microplaca en el sistema por 5 segundos, si no lo tiene, agitar manualmente con mucha precaución.
9. Dejar reposar durante 15 minutos
10. Leer la absorbancia de los pozos a 620nm. Las absorbancias serán estables alrededor de 1 hora.
TERMINA PROCEDIMIENTO

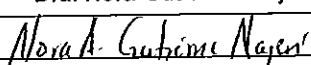
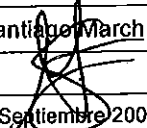
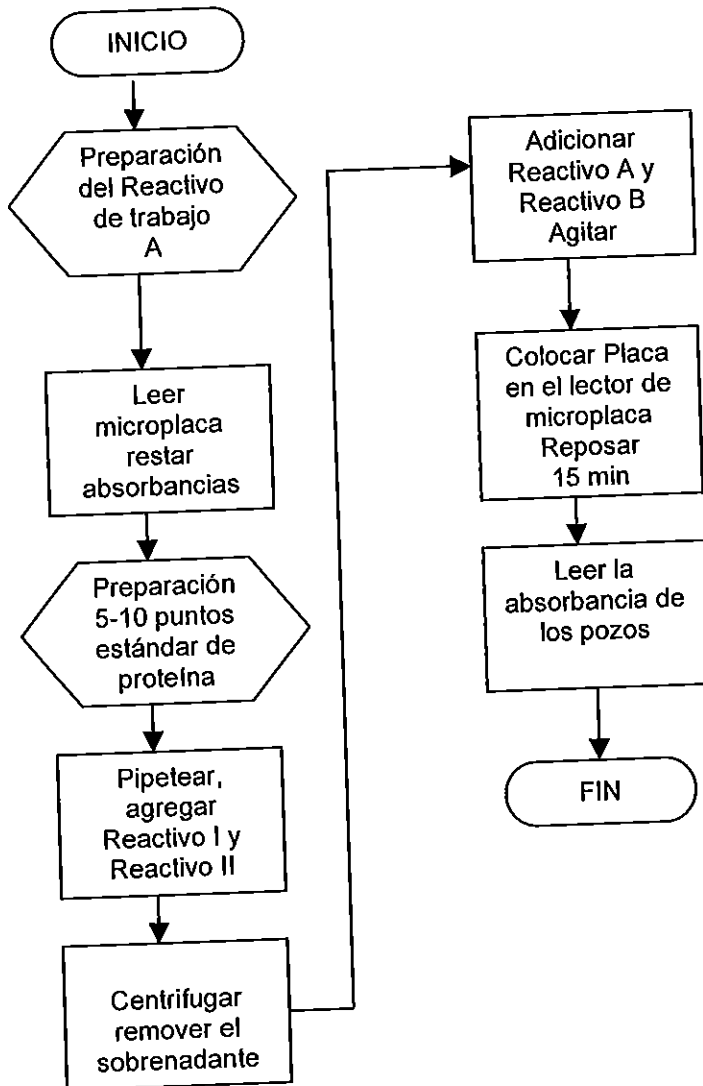
CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró :	Revisó :	Autorizó:
Nombre	Dra. Nora Gutiérrez Nájera	Dr. Santiago March Mifsut	Dr. Gerardo Jiménez Sánchez
Firma			
Fecha	Septiembre 2008	Septiembre 2008	Septiembre 2008

Diagrama de flujo del Método RC-DC Biorad



CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró :	Revisó :	Autorizó:
Nombre	Dra. Nora Gutiérrez Nájera	Dr. Santiago March Mifsut	Dr. Gerardo Jiménez Sánchez
Firma	<i>Nora A. Gutiérrez Nájera</i>	<i>[Signature]</i>	<i>[Signature]</i>
Fecha	Septiembre 2008	Septiembre 2008	Septiembre 2008

 SALUD SECRETARÍA DE SALUD	 MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN UNIDAD DE PROTEÓMICA MÉDICA	 Instituto Nacional de Medicina Genómica MEXICO	Código:
			Rev.
			Hoja: 29 de 70

II. D) Descripción del Procedimiento Isoelectroenfoque

1. Se prepara la muestra de proteína con la cantidad adecuada de proteína (esta dependerá de la longitud e intervalo de pH de la tira de isoelectroenfoque a utilizar)
2. A la cantidad de proteína indicada se le añade volumen de solución de hidratación (Urea 7M, CHAPS 2% IPG buffer .25% azul de bromofenol al 0.002%) de la tira que se necesita para que se hidrate la tira (esta cantidad también depende de la longitud y del intervalo de pH de la tira que se utilizará)
3. Se coloca en la bandeja con canales la muestra con proteína, en un canal se coloca del centro desplazándola con la micropipeta hacia lo largo del canal tratando de cubrir la longitud de la tira.
4. Se coloca la tira de isoelectroenfoque (previamente se retira la protección plástica que protege el gel de la tira).
5. Se debe tener cuidado de que no se dejen burbujas en el contacto de la muestra y la tira
6. Se cubre la tira con aceite mineral para que durante la hidratación no se seque la muestra.
7. Se debe dejar hidratar la tira de 15-24 horas
8. Cuando se termine el periodo de hidratación se coloca la tira en el apartado de isoelectroenfoque (IPGphor III GE) el cual tiene una bandeja cerámica con canales
9. Cada tira se coloca en un canal diferente teniendo cuidado de colocar el gel hacia arriba.
10. Se colocan los electrodos y se cubren las tiras con aceite mineral
11. Se programa el voltaje del apartado de acuerdo a lo que el fabricante indica en sus manuales lo que dependerá de la longitud de la tira, intervalo de pH y el número de tiras a utilizar.
12. Al concluir el isoelectroenfoque se procede a teñirse de acuerdo al protocolo 1.4. (opcional)
TERMINA PROCEDIMIENTO

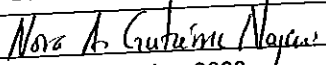
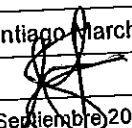
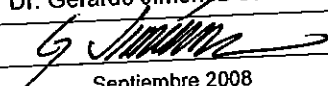
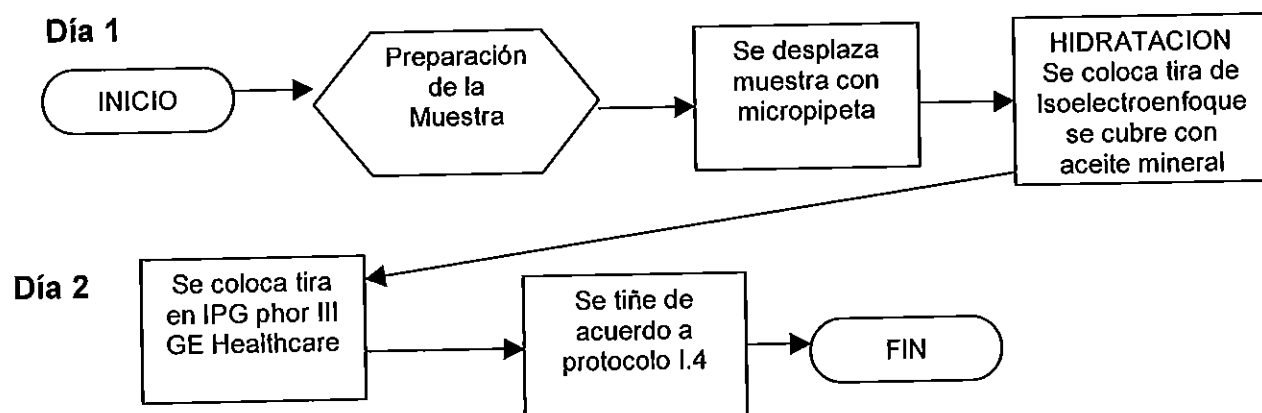
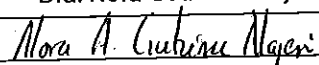
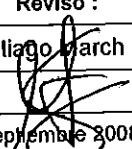
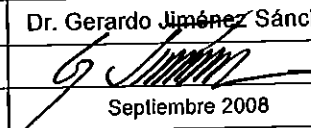
CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró :	Revisó :	Autorizó:
Nombre	Dra. Nora Gutiérrez Nájera	Dr. Santiago March Mifsut	Dr. Gerardo Jiménez Sánchez
Firma			
Fecha	Septiembre 2008	Septiembre 2008	Septiembre 2008

Diagrama de flujo del procedimiento II. Isoelectroenfoque



CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró :	Revisó :	Autorizó:
Nombre	Dra. Nora Gutiérrez Nájera	Dr. Santiago March Mifsut	Dr. Gerardo Jiménez Sánchez
Firma			
Fecha	Septiembre 2008	Septiembre 2008	Septiembre 2008

III. Procedimiento para la separación de proteínas para geles 2D (pl SDS-PAGE)

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró :	Revisó :	Autorizó:
Nombre	Dra. Nora Guliérrez Nájera	Dr. Santiago March Mifsut	Dr. Gerardo Jiménez Sánchez
Firma	<i>Nora A. Guliérrez Nájera</i>	<i>[Signature]</i>	<i>[Signature]</i>
Fecha	Septiembre 2008	Septiembre 2008	Septiembre 2008

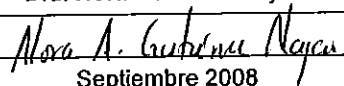
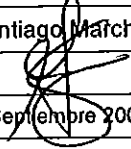
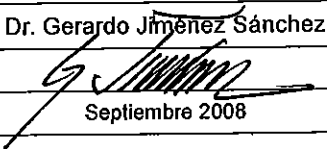
Descripción del procedimiento para la separación de proteínas para geles 2D (pl SDS-PAGE)

1. Limpieza de la muestra (método TCA/acetona ver inciso 2.1)
2. Cuantificación (opcional) ver inciso 2.2
3. Isoelectroenfoque (ver inciso 2.3)
4. Electroforesis en gel en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE)
 - a) Se elaboran los geles para la segunda dimensión de acuerdo a la siguiente tabla. Para 900 mL

Concentración final del gel	10%	12.5%	15%
Solución del monomero (sol G)	300ml	375ml	450ml
4x buffer de resolución del gel (sol H)	225ml	225ml	225ml
10% SDS (sol J)	9ml	9ml	9ml
Agua doblemente -destilada	360.7 ml	285.7ml	210.8ml
10% persulfato de amonio (sol K)	5ml	5ml	5ml
TEMED	0.30ml	0.25ml	0.20ml
Volumen total	900ml	900ml	900ml

- b) ANTES DE 2ª.DIMENSIÓN SE TIENE QUE EQUILIBRAR
- c) Colocar las tiras IPG en tubos individuales con el film de soport pegado a la pared del tubo
- d) Preparar un apropiado volumen de amortiguador de equilibrio y medir con iguales volúmenes
- e) Adicionar DTT por una porción (100mg por 10mL) y otra de iodocetamida (250mg por 10mL)
- f) Adicionar un apropiado volumen de amortiguador de equilibrio más DTT (100mg por cada 10mL) para cada tira. Tapa o sella los tubos con parafilm y colocarlos de lado esperar por 15 min.
- g) Volver a vaciar buffer y adicionar un apropiado volumen de buffer SDS de equilibrio más iodocetamina para cada tira y dejar 15 min. más

Tamaño de tira (cm)	contenedor	solución de equilibrio (mL)
11	25x200mm tubos de cultivo	5-10
18	25x200mm tubos de GE	10-15

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró :	Revisó :	Autorizó:
Nombre	Dra. Nora Gutiérrez Nájera	Dr. Santiago March Mifsut	Dr. Gerardo Jiménez Sánchez
Firma			
Fecha	Septiembre 2008	Septiembre 2008	Septiembre 2008

- h) Se coloca la tira después de la etapa de equilibrio sobre el gel elaborado en el primer paso.
- i) Se sella la tira con el gel cuadrado con agarosa al 0.5%
- j) Se llena la cámara con agua para observar si no se sale por alguna fuga el buffer.
- k) El buffer del cátodo se vació en el interior de la cámara de los geles
- l) Se corrieron los geles a 30 V con la fuente de poder a toda la corriente hasta que llegó al gel separador. Cuando llegaron al gel separador se aumentó a 90-150V y a toda corriente
- m) Se dejó que siguiera corriendo el gel hasta que se salió todo el colorante de las muestras.

5. Tinción (ver inciso I.4)

6. Escaneo del gel (ver inciso I.5)

7. Análisis de la imagen del gel (Software ImageMaster 2D Platinum 6.0)

- a) Se hace oprimir dos veces sobre el icono del software ImageMaster 2D Platinum 6.0
- b) Cuando se ha abierto se presiona sobre la pestaña del espacio de trabajo (*workspace*) y se busca el espacio de trabajo donde se desea analizar el gel
- c) Se abre el proyecto donde se analizará el gel
- d) En la sección de geles (*gels*) se oprime el botón derecho del ratón y aparece la opción para añadir gel (*add*)
- e) Se busca el archivo de la imagen del gel
- f) Se abre la imagen (*Open> In Worksheet*)
- g) Se ajusta el contraste si es necesario (*Show>Gels> Adjust contrast*)
- h) Se detectan las manchas de proteínas (*Edit >Spot>detect*)
- i) Se analizan las manchas de proteínas de acuerdo a la forma de la curva en la imagen tridimensional (*3D view*)
- j) Se compararán geles de 2 muestras diferentes abriendo en la misma *worksheet* la imagen de 2 o más muestras.
- k) Se decide cual (es) manchas se van a picar para identificarlas por espectrometría de masas.

TERMINA PROCEDIMIENTO

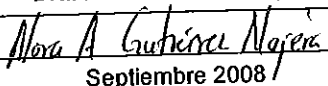
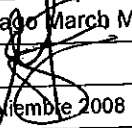
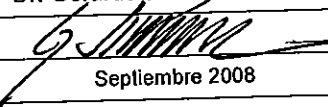
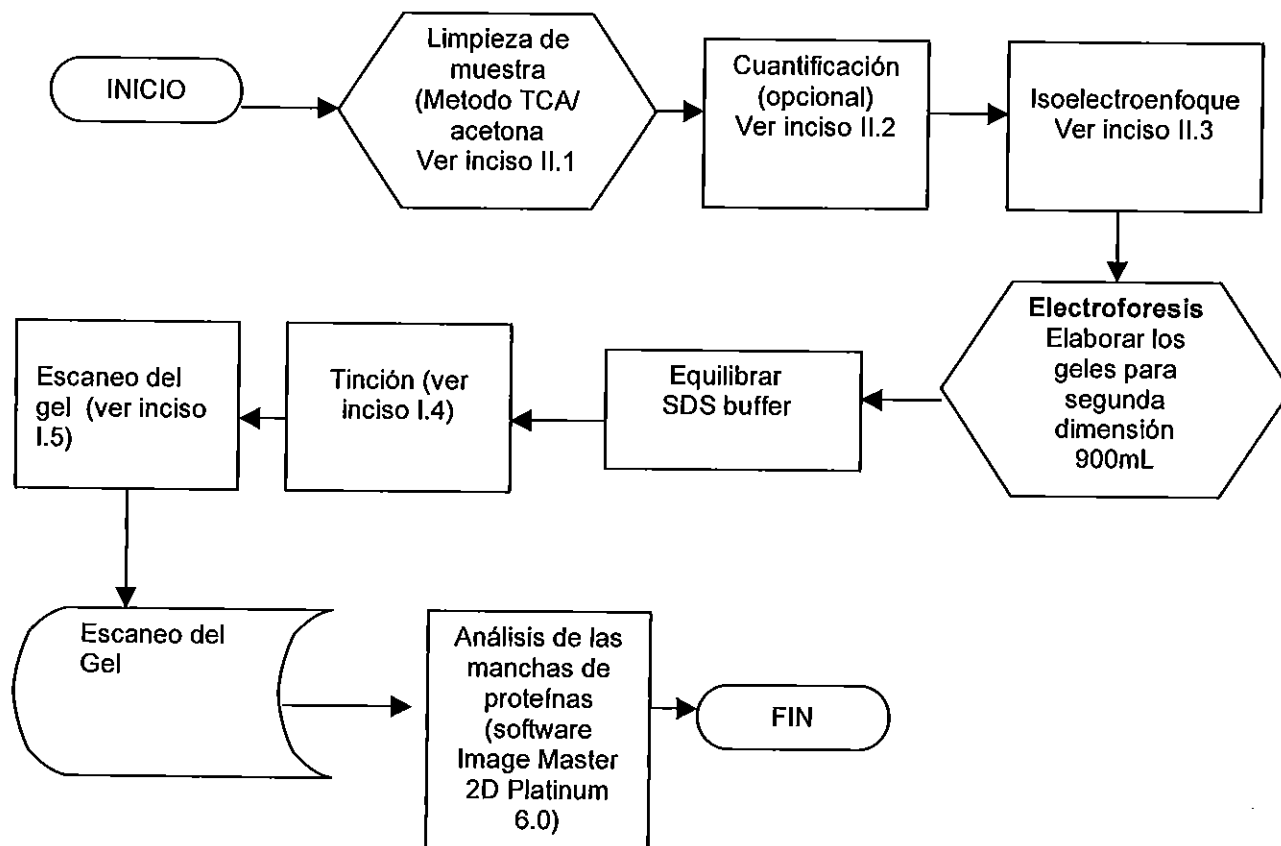
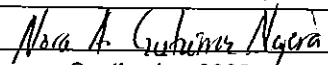
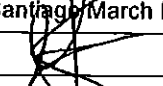
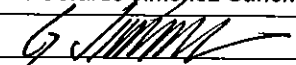
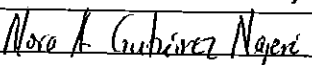
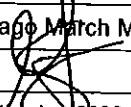
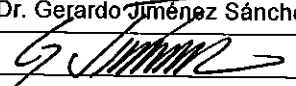
CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró :	Revisó :	Autorizó:
Nombre	Dra. Nora Gutiérrez Nájera	Dr. Santiago March Mifsut	Dr. Gerardo Jiménez Sánchez
Firma			
Fecha	Septiembre 2008	Septiembre 2008	Septiembre 2008

Diagrama de flujo del procedimiento para la separación de proteínas para geles 2D (pl. SDS-PAGE)



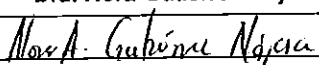
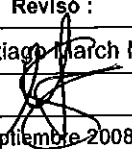
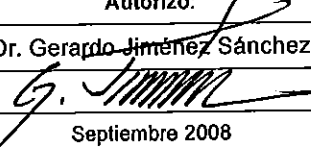
CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró :	Revisó :	Autorizó:
Nombre	Dra. Nora Gutiérrez Nájera	Dr. Santiago March Mifsut	Dr. Gerardo Jiménez Sánchez
Firma			
Fecha	Septiembre 2008	Septiembre 2008	Septiembre 2008

IV. Procedimiento para el marcaje molecular de proteínas por el método de electroforesis diferencial en gel (DIGE)

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró :	Revisó :	Autorizó:
Nombre	Dra. Nora Gutiérrez Nájera	Dr. Santiago March Mifsut	Dr. Gerardo Jiménez Sánchez
Firma			
Fecha	Septiembre 2008	Septiembre 2008	Septiembre 2008

Descripción del Procedimiento para el marcaje molecular de proteínas por el método de electroforesis diferencial en gel (DIGE)

IV. 1 Limpieza de proteína (Método cloroformo- metanol)
1. Agregar a una cantidad determinada de muestra el volumen suficiente de agua para completar 100µL
2. Agregar 300µL (3 volúmenes) de agua miliQ
3. Adicionar 400µL (4 volúmenes) de metanol
4. Adicionar 400µL (1 volumen) de cloroformo
5. Mezcle vigorosamente y centrifugue a 15000 rpm durante 15 minutos. El precipitado de proteína aparecerá en la interfase entre la fase acuosa (agua-metanol) y la fase orgánica (cloroformo)
6. Remover la fase acuosa (mezcla agua-metanol) de la superficie de la interfase siendo cuidadoso de no dañar la interfase
7. Adicionar 400µL de metanol para lavar el precipitado
8. Mezcle vigorosamente y centrifugar nuevamente a 15000 rpm durante 15 minutos. La proteína se precipitará al fondo del tubo.
9. Remover el sobrenadante y secar el precipitado en una centrifuga de vacío
10. Resuspender el precipitado de proteína en la solución para el marcaje con cianinas (Cy2, Cy3 y Cy5)
IV.2 Cuantificación (lo mismo que en inciso II.2)
IV.3 Marcaje con Cy2, Cy3 y Cy5
1. Tome 20µL (por ejemplo) de volumen de DMF de su contenedor original y dispense en un tubo de centrifuga nuevo.
2. Tome el CyDye del congelador (-15°C a 30°C) y dejese calentar por 5 minutos a temperatura ambiente
3. Después de 5 minutos añadir un volumen específico de DMF a cada vial nuevo de CyDye (ver especificaciones en la hoja de instrucciones que viene con ICyDye) Esto nos da una concentración del CyDye de 1 mM
4. Tape el tubo y agite vigorosamente por 30 segundos y centrifugue a 12000 xg en una microfuga durante 30 segundos. En fluoroforo está listo para ser usado.
5. Esta solución stock de CyDye se debe mantener de -15°C a 30°C tan pronto como sea posible y mantenerla en la oscuridad.
Después de la reconstrucción del CyDye, éste es estable y usable hasta la fecha de caducidad marcada en el envase o por 2 meses, lo que suceda primero.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró :	Revisó :	Autorizó:
Nombre	Dra. Nora Gutiérrez Nájera	Dr. Santiago March Mifsut	Dr. Gerardo Jiménez Sánchez
Firma			
Fecha	Septiembre 2008	Septiembre 2008	Septiembre 2008

6. Dar un breve spin a la solución stock del CyDye preparada en la sección anterior.

7. Añadir un volumen de la solución stock del CyDye a 1.5 volúmenes del DMF de alto grado para realizar una solución 400µM de CyDye. Por ejemplo tome 2µL de solución stock CyDye y añadir 3µL de DMF para dar 400 pmoles de CyDye en 1µL.

8. Se recomienda que 50µg de proteína sea etiquetado con 400 pmo1 de CyDye. En cada tubo de CyDye habrá una solución stock de estándar de 1 mM CyDye.

9. Ejemplo de diluciones de CyDye que se utilizan se muestran en el tabla (se recomienda el ejemplo que se resalta)

Volumen del stock de CyDye (µL)	Volumen añadido DMF (µL)	Volumen total (µL)	Concentración de CyDye (pmol/µL)
1	4	5	200
2	3	5	400
2	2	4	500
11	-	1	1000

La solución de trabajo de CyDye es estable solamente por 1 semana a -15°C a -30°C
 Etiquetado mínimo de una muestra de proteína

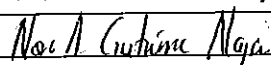
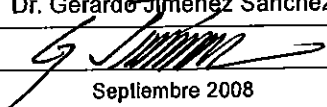
La concentración recomendada de lisado de proteína debe estar entre 5 y 10 mg/ml. Las muestras que contienen de 1 mg/mL a 20 mg/mL se han etiquetado exitosamente usando el protocolo de abajo.

La cantidad de CyDye usada en la reacción de marcado tendrá que estar determinado individualmente para el tipo de muestra a ser analizada.

1.- Añadir un volumen de muestra de proteína equivalente a 50 µg a un tubo de microfuga. Las reacciones de marcaje de proteínas de mayores cantidades de proteína se pueden realizar también usando una mayor cantidad de CyDye y proteína.

2.- Añadir 1 µL de CyDye diluido al tubo de microfuga que contiene la muestra (por ejemplo 50 mg de proteína será marcada con 400 pmol de fluoroforo para la reacción de etiquetado.

3.- Mezcle y centrifugue brevemente en una microcentrífuga. Deje en hielo por 30 minutos en la oscuridad.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró :	Revisó :	Autorizó:
Nombre	Dra. Nora Gutiérrez Nájera	Dr. Santiago March Mifsut	Dr. Gerardo Jiménez Sánchez
Firma			
Fecha	Septiembre 2008	Septiembre 2008	Septiembre 2008

- 4.- Se añade 1 mL de Lisina 10 mM para parar la reacción. Mezcle por pipeteo y agite brevemente en una microfuga.
- 5.- Deje por 10 minutos en hielo en la oscuridad
- 6.- Las muestras ahora pueden ser guardadas a -70 °C en la oscuridad por 3 meses.

Carga de muestras en las tiras IPG

Después de que las muestras de proteínas han sido marcadas con CyDye añadir un volumen igual de 2X de solución amortiguadora de la muestra y dejarlo por 10 minutos en hielo.

Mezclar las muestras de proteína que van a ser separadas en el gel de primera y segunda dimensión

El volumen total de proteína marcada necesita realizarse al volumen requerido para cada tira usando el amortiguador de rehidratación.

Ejemplo

Una muestra de proteína marcada con CyDye (50 µg)	20 µL
Añadir un volumen igual de solución amortiguadora de la muestra 2X	20 µL + 20 µL = 40 µL
Añadir las 3 muestras juntas	40 µL X 3 = 120 µL
Volumen total	120 µL

Una tira de 24 cm de IPG necesita un volumen total de 450 µl así añadida (450 µl-120 µl)= 330 µl de amortiguador de rehidratación.

IV.4 Isoelectroenfoque (ver inciso II.3)

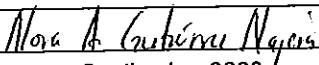
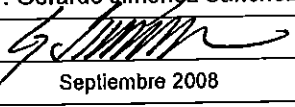
Nota: Todo el proceso debe realizarse en la oscuridad.

IV.5 Electroforesis SDS-PAGE (ver inciso III.4)

Nota: Todo el proceso debe realizarse en la oscuridad.

IV.6 Escaneo del gel

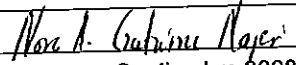
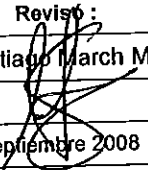
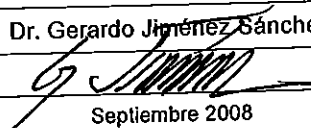
1. Asegurar que la puerta de escáner esté cerrada, prender el escáner y la estación de trabajo, una luz indicará que el aparato ya está en función.
2. Cuando la luz se vuelve amarilla en el escáner, éste hace un reconocimiento y la luz se apaga. La luz del escáner se prende cuando el sistema adquiere los datos.
3. Cuando la luz se prende el sistema está listo para escanear la lámpara y la cámara ha adquirido la temperatura que se requiere.
4. Antes de escanear un gel, se debe insertar un cassette. Éstos son diseñados para diferentes propósitos.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró :	Revisó :	Autorizó:
Nombre	Dra. Nora Gutiérrez Nájera	Dr. Santiago March Mifsut	Dr. Gerardo Jiménez Sánchez
Firma			
Fecha	Septiembre 2008	Septiembre 2008	Septiembre 2008

5. Para Ettan DIGE imagen se recomienda los cassetes que tienen baja fluorescencia.
6. En la ventana que aparece después de dar clic al icono del programa aparecen varias opciones: **setup, scan, report.**
7. Al presionar el icono de **setup** se abren una serie de parámetros, la primera modificación es en **gel format**. Este parámetro sirve para crear un área de escaneo.
 8. Se seleccionan los siguientes parámetros:
 - 8.1 Opción 1 **predefined gel formats**
 - 8.2 Es para GIGE ETTAN DALT, Se600 y para 1 a 6 geles miniVE
 - 8.3 Opción 2 **User select**
 - 8.4 Es para seleccionar el área de escaneo manual a través del uso del Mouse
 - 8.5 Opción 3 **user defined ge format/custom gel format**
 - 8.6 Se puede usar un formato predeterminado de la lista del área creada.
 - 8.7 El icono **chemistry** Aquí se especifica el tipo de sustancia química utilizada de la lista que despliega.
 - 8.8 En **pixel size** Se selecciona el tamaño de los pixeles en el caso de DeCyder 100µm son las indicadas
 - 8.9 **Channels and dyes**. Se debe poner en orden numérico y el programa pone automáticamente el filtro usado.
 - 8.10 **Exposure** se selecciona un canal adecuado de una lista que despliega
 - 8.11 En **comments** se puede poner comentarios de los datos a analizar
9. La exposición puede ser creada de 0.2 a 4 seg. La exposición depende del tipo y cantidad de fluoróforo presente. Se puede escanear solamente una pequeña área para identificar una pequeña exposición en donde las manchas sean más intensas.
10. La opción de **scan** empieza el escaneo de la muestra y mientras esto sucede la calidad de cada parámetro se despliega en una ventana.
11. Para el **view report** se escoge **select scan area** y se da un clic en **view report**

IV. 7 Análisis de la imagen del gel por DeCyder 6.5

1. Se abre el programa
2. Se oprime dos veces el icono del primer modulo para cargar imágenes
3. Se oprime en el botón de **add** para cargar las imágenes del archivo con formato DIGE que consta de 2 o 3 imágenes dependiendo de la química
4. Ya que se cargaron las imágenes se selecciona la química DIGEmin o DIGE sat.
5. Se busca el espacio de trabajo donde se desean importar las imágenes (el icono en forma de archivero) y se presiona el botón de **import**

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró :	Revisó :	Autorizó:
Nombre	Dra. Nora Gutiérrez Nájera	Dr. Santiago March Mifsut	Dr. Gerardo Jiménez Sánchez
Firma			
Fecha	Septiembre 2008	Septiembre 2008	Septiembre 2008

SALUD SECRETARÍA DE SALUD		MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS		 Instituto Nacional de Medicina Genómica MEXICO	Código:
		DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN			Rev.
		UNIDAD DE PROTEÓMICA MÉDICA			Hoja: 40 de 70

6. Se minimiza esa pantalla y se abre el módulo de DIA (análisis diferencial en gel) cuando se realiza sólo un análisis de muestras que se encuentran en el mismo archivo DIGE
7. Si se desea realizar el análisis de varios geles DIGE se abre el módulo BVA (análisis de variabilidad biológica)
8. Se determinan cuales manchas de proteínas se van a analizar por espectrometría de masas.
TERMINO DEL PROCEDIMIENTO

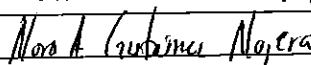
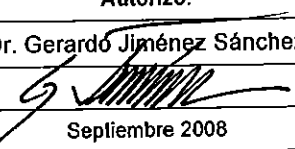
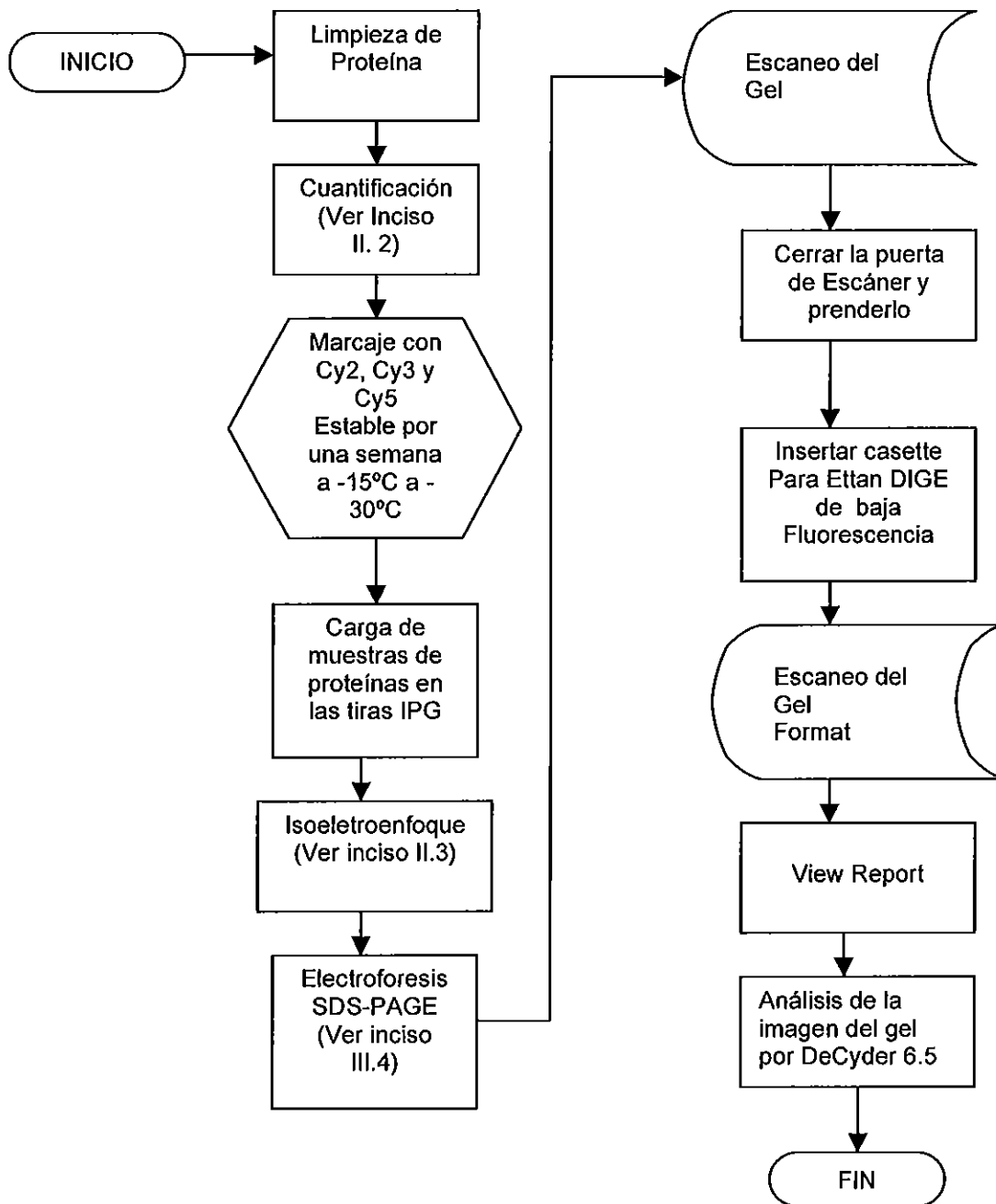
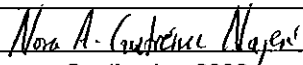
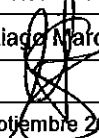
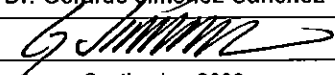
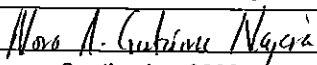
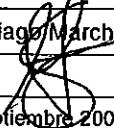
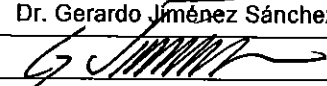
CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró :	Revisó :	Autorizó:
Nombre	Dra. Nora Gutiérrez Nájera	Dr. Santiago March Mifsut	Dr. Gerardo Jiménez Sánchez
Firma			
Fecha	Septiembre 2008	Septiembre 2008	Septiembre 2008

Diagrama de flujo del procedimiento marcaje molecular de proteínas por el método de electroforesis diferencial en gel (DIGE)



CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró :	Revisó :	Autorizó:
Nombre	Dra. Nora Gutiérrez Nájera	Dr. Santiago March Mifsut	Dr. Gerardo Jiménez Sánchez
Firma			
Fecha	Septiembre 2008	Septiembre 2008	Septiembre 2008

V. Procedimiento para la determinación de m/z de un Péptido o una Proteína

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró :	Revisó :	Autorizó:
Nombre	Dra. Nora Gutiérrez Nájera	Dr. Santiago March Mifsut	Dr. Gerardo Jiménez Sánchez
Firma			
Fecha	Septiembre 2008	Septiembre 2008	Septiembre 2008

 SALUD SECRETARÍA DE SALUD	 MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN UNIDAD DE PROTEÓMICA MÉDICA	 Instituto Nacional de Medicina Genómica	Código:
			Rev.
			Hoja: 43 de 70

Descripción del procedimiento para la determinación de m/z de un Péptido o una Proteína. (Equipo MALDI 4800 TOF/TOF plus o ESI-LTQ/Orbitrap)

Especificación de la muestra: Debe estar en solución acuosa o en un buffer con bajo contenido de sales.

De no ser así se debe remover las sales mediante el procedimiento adecuado

Reactivos:

- Ácido α -ciano-4 hidroxicinámico (α CHCA)
- Acetonitrilo grado HPLC (ACN)
- Agua grado HPLC (H_2O)
- Ácido Trifluoro acético (TFA)

Soluciones:

- Matriz: solución de α CHCA 10 mg/L en ACN/ H_2O / TFA (50:50:0.1)
- Pesar en en un vial del 1.5 mL 10mg de α CHCA
 Agregar 500 μ L de H_2O
 Adicionar 1 μ L de TFA
 Usar el vortex para homogeneizar

Procedimiento para MALDI TOF/TOF 4800

1. Agregar en una placa para MALDI, 1.0 μ L de la solución a analizar

2. Adicionar 1.0 μ L de matriz antes de que la muestra seque completamente

3. Adquiera el espectro correspondiente y reporte m/z así como la exactitud de las mediciones en ppm.

Para ESI-LTQ-Orbitrap

1. Agregar 10 μ L de muestra en 40 μ L de agua 0.1% TFA

2. Transferir la muestra en una jeringa para introducir la muestra por infusión

3. Adquiera el espectro de alta o baja resolución

4. Reporte m/z y la exactitud de las mediciones en ppm

Termina el procedimiento

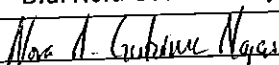
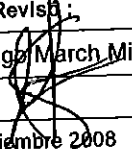
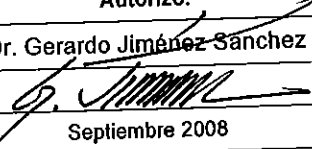
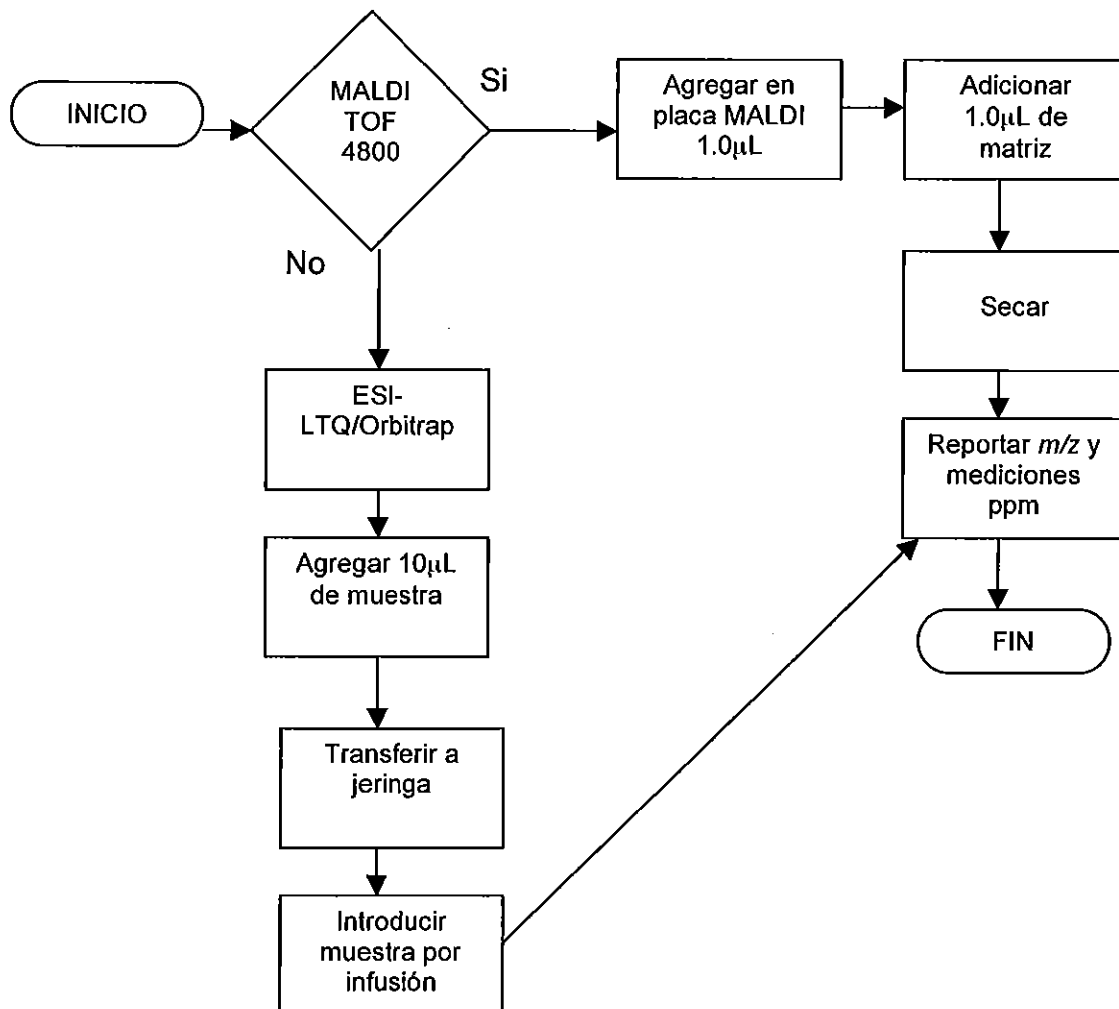
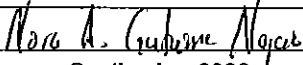
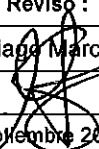
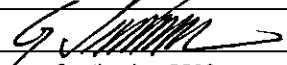
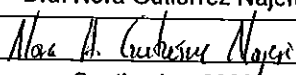
CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró :	Revisó :	Autorizó:
Nombre	Dra. Nora Gutiérrez Nájera	Dr. Santiago March Mifsut	Dr. Gerardo Jiménez Sánchez
Firma			
Fecha	Septiembre 2008	Septiembre 2008	Septiembre 2008

Diagrama de flujo para la determinación de m/z de un Péptido o una Proteína. (Equipo MALDI 4800 plus o ESI-LTQ-Orbitrap)



CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró :	Revisó :	Autorizó:
Nombre	Dra. Nora Gutiérrez Nájera	Dr. Santiago March Mifsut	Dr. Gerardo Jiménez Sánchez
Firma			
Fecha	Septiembre 2008	Septiembre 2008	Septiembre 2008

VI. Procedimiento para Identificación de proteínas por MALDI-TOF/TOF (Directa)

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró :	Revisó:	Autorizó:
Nombre	Dra. Nora Gutiérrez Nájera	Dr. Santiago March Mifsut	Dr. Gerardo Jiménez Sánchez
Firma			
Fecha	Septiembre 2008	Septiembre 2008	Septiembre 2008

Descripción del procedimiento para identificación de proteínas por MALDI-TOF/TOF (Directa)

Especificación de la muestra.-

La muestra debe estar en solución acuosa o en un buffer con bajo contenido de sales
 De no ser así remover las sales mediante el procedimiento adecuado.

Reactivos:

- Ácido α -ciano-4-hidroxicinámico
- Acetonitrilo grado HPLC (ACN)
- Agua grado HPLC (H_2O)
- Ácido Trifluoro acético (TFA)

Soluciones:

- Matriz: solución de α CHCA 10 mg/L en ACN/ H_2O / TFA (50:50:0.1)
 Pesar en en un vial del 1.5 mL 10mg de α CHCA
 Agregar 499.5 μ L de H_2O
 Adicionar 1 μ L de TFA
 Usar el vortex para homogeneizar

Procedimiento para MALDI -TOF/TOF 4800

1. Agregar 1.0 μ L en cuatro diferentes "spots"
2. Adicionar a cada spot 1.0 μ L de matriz antes de que la muestra seque completamente
3. Seguir el procedimiento del software del equipo;
 Adquirir un espectro "full scan" de cada muestra y seleccionar las señales más intensas que representan a los péptidos ionizados presente en la muestra (las 45 señales más intensas)
4. Cada péptido ionizado seleccionado se fragmenta en la celda de colisión en las condiciones de experimentación a fin de obtener el espectro de masas de iones fragmento para cada ion precursor.
5. Analizar los archivos por medio de Protein Pilot para obtener una lista de proteínas identificadas mediante el algoritmo PARAGON o MASCOT

TERMINA PROCEDIMIENTO

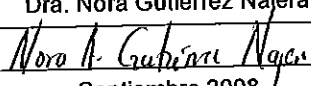
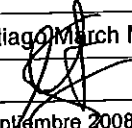
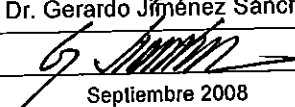
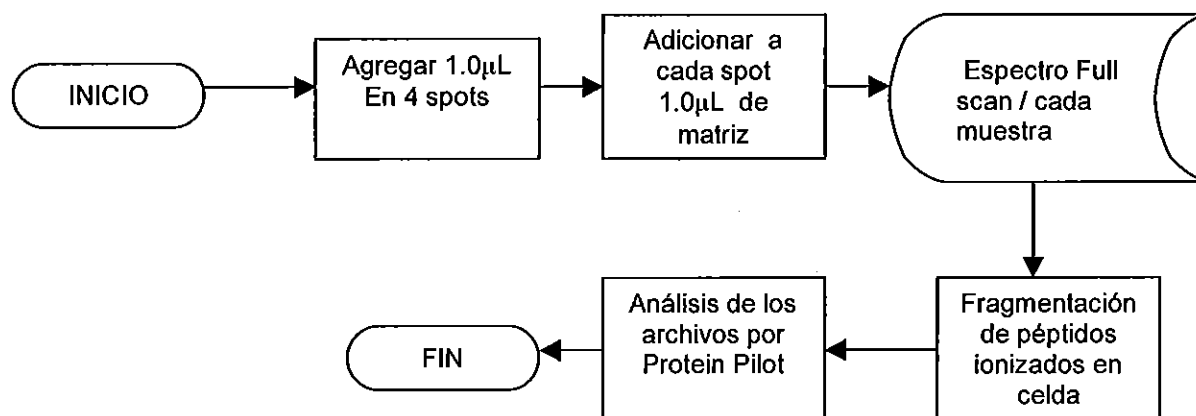
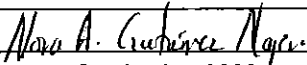
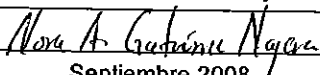
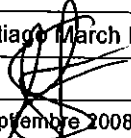
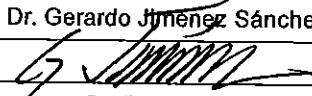
CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró :	Revisó :	Autorizó:
Nombre	Dra. Nora Gutiérrez Nájera	Dr. Santiago March Mifsut	Dr. Gerardo Jiménez Sánchez
Firma			
Fecha	Septiembre 2008	Septiembre 2008	Septiembre 2008

Diagrama de Flujo del procedimiento para identificación de proteínas por MALDI-TOF-TOF (Directa)



CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró :	Revisó :	Autorizó:
Nombre	Dra. Nora Gutiérrez Nájera	Dr. Santiago March Mifsut	Dr. Gerardo Jiménez Sánchez
Firma			
Fecha	Septiembre 2008	Septiembre 2008	Septiembre 2008

VII. Procedimiento para identificación de proteínas por MALDI-TOF/TOF (usando HPLC)

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró :	Revisó :	Autorizó:
Nombre	Dra. Nora Gutiérrez Nájera	Dr. Santiago March Mifsut	Dr. Gerardo Jiménez Sánchez
Firma			
Fecha	Septiembre 2008	Septiembre 2008	Septiembre 2008

Descripción del procedimiento identificación de proteínas por MALDI TOF/TOF (usando HPLC)

Especificación de la muestra.-

La muestra debe estar en solución acuosa o en un buffer con bajo contenido de sales
 De no ser así remover las sales mediante el procedimiento adecuado.

Reactivos:

- Ácido α -ciano-4-hidroxicinámico
- Acetonitrilo grado HPLC (ACN)
- Agua grado HPLC (H_2O)
- Ácido Trifluoro acético (TFA)

Soluciones:

1. Matriz: solución de α CHCA 10 mg/L en ACN/ H_2O / TFA (50:50:0.1)
 Pesar en un vial del 1.5 mL 10mg de α CHCA
 Agregar 500 μ L de ACN
 Agregar 500 μ L de H_2O
 Adicionar 1 μ L de TFA
 Usar el vortex para homogeneizar
2. Acetonitrilo 0.1% TFA
3. H_2O 0.1% TFA

Equipo MALDI 4800 LC Tempo

Procedimiento vía HPLC

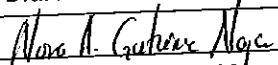
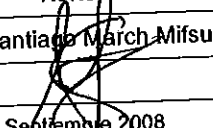
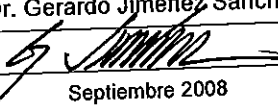
1. Se inyecta la muestra utilizando el LC Tempo utilizando ACN (0.1% TFA) y H_2O como fases móviles

2. El gradiente de elución se selecciona de acuerdo a la muestra, sin embargo el más común se describe a continuación:

Tiempo (min)	% ACN (0.1%) TFA
0	2
15	40
29	80
25	80
30	2
0	

3. La muestra se coloca automáticamente sobre la placa adecuada

4. Análisis MALDI- TOF/TOF 4800

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró :	Revisó :	Autorizó:
Nombre	Dra. Nora Gutiérrez Nájera	Dr. Santiago March Mifsut	Dr. Gerardo Jiménez Sánchez
Firma			
Fecha	Septiembre 2008	Septiembre 2008	Septiembre 2008

SALUD SECRETARÍA DE SALUD		MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS	 Instituto Nacional de Medicina Genómica MEXICO	Código:
		DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN		Rev.
		UNIDAD DE PROTEÓMICA MÉDICA		Hoja: 50 de 70

5. Adquirir un espectro "full scan" de cada muestra y seleccionar las señales más intensas que representan a los péptidos ionizados presente en la muestra (las 45 señales más intensas)
6. Cada péptido ionizado seleccionado debe de fragmentarse en la celda de colisión en las condiciones estándares de experimentación a fin de obtener el espectro de masas de iones fragmento para cada ion precursor.
7. Analizar los archivos por medio de Protein Pilot para obtener una lista de proteínas identificadas mediante el algoritmo PARAGON o MASCOT
TERMINA EL PROCEDIMIENTO

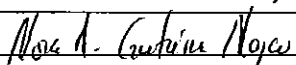
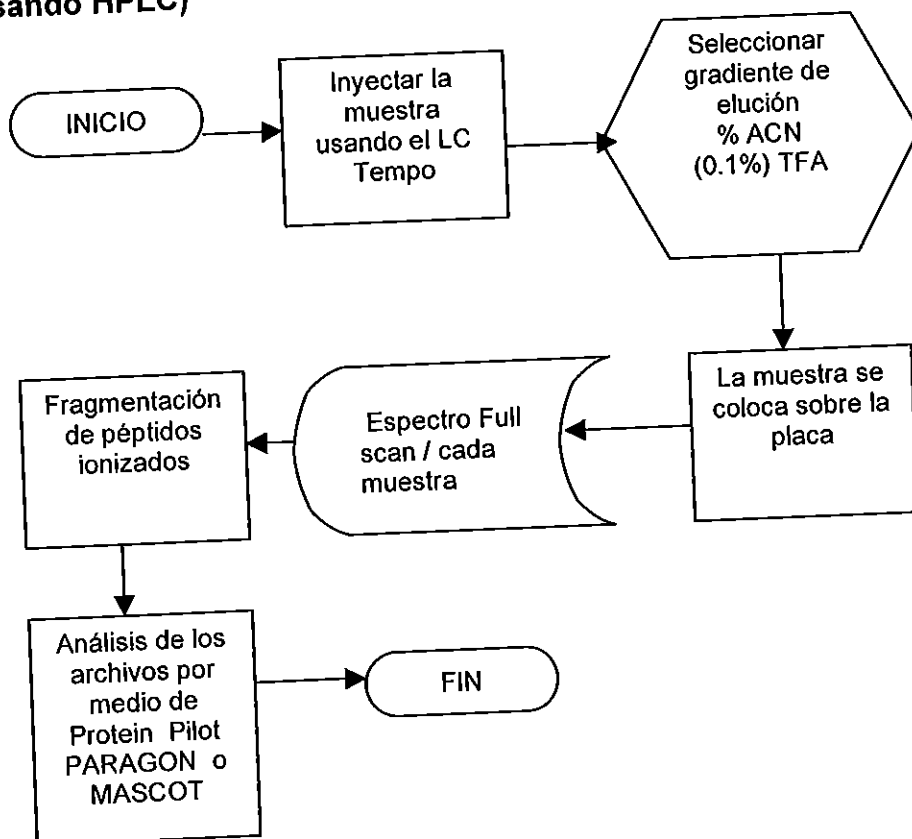
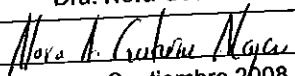
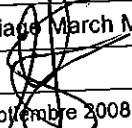
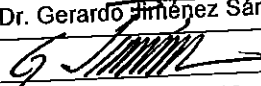
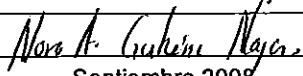
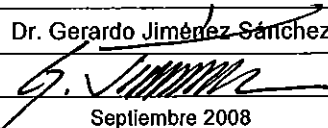
CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró :	Revisó:	Autorizó:
Nombre	Dra. Nora Gutiérrez Nájera	Dr. Santiago March Mifsut	Dr. Gerardo Jiménez Sánchez
Firma			
Fecha	Septiembre 2008	Septiembre 2008	Septiembre 2008

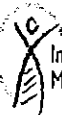
Diagrama de flujo del procedimiento identificación de proteínas por MALDI TOF-TOF (usando HPLC)



CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró :	Revisó :	Autorizó:
Nombre	Dra. Nora Gutiérrez Nájera	Dr. Santiago March Mifsut	Dr. Gerardo Jiménez Sánchez
Firma			
Fecha	Septiembre 2008	Septiembre 2008	Septiembre 2008

VIII. Identificación de proteínas por MALDI-LTQ/Orbitrap (Directa)

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró :	Revisó :	Autorizó:
Nombre	Dra. Nora Gutiérrez Nájera	Dr. Santiago March Mifsut	Dr. Gerardo Jiménez Sánchez
Firma			
Fecha	Septiembre 2008	Septiembre 2008	Septiembre 2008

SALUD SECRETARÍA DE SALUD	 MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN UNIDAD DE PROTEÓMICA MÉDICA	 Instituto Nacional de Medicina Genómica México	Código: Rev. Hoja: 53 de 70
--	--	---	--

Descripción del procedimiento para identificación de proteínas por MALDI-LTQ/Orbitrap (Directa)

Especificación de la muestra.- La muestra debe estar en solución acuosa o en un buffer con bajo contenido de sales De no ser así remover las sales mediante el procedimiento adecuado.
Reactivos: • Ácido α-ciano-4-hidroxicinámico • Acetonitrilo grado HPLC (ACN) • Agua grado HPLC (H_2O) • Ácido Trifluoro acético (TFA)
Soluciones: 4. Matriz: solución de α CHCA 10 mg/L en ACN/ H_2O / TFA (50:50:0.1) Pesar en un vial de 1.5 mL 10mg de α CHCA Agregar 500 μ L de ACN Agregar 500 μ L de H_2O Adicionar 1 μ L de TFA Usar el vortex para homogeneizar
Equipo MALDI duo-LTQ-Orbitrap
Procedimiento.
1. Agregar 1.0 μ L en cuatro diferentes "spots"
2. Adicionar a cada spot 1.0 μ L de matriz antes de que la muestra seque completamente
3. Seguir el procedimiento del software del equipo; Adquirir un espectro "full scan" de cada muestra y seleccionar las señales más intensas que representan a los péptidos ionizados presente en la muestra (las 45 señales más intensas)
4. Cada péptido ionizado seleccionado se fragmenta en la celda de colisión en las condiciones de experimentación.
5. Análisis de los archivos por medio de Bioworks con el algoritmo SEQUEST
TERMINA PROCEDIMIENTO

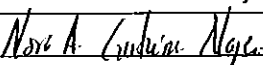
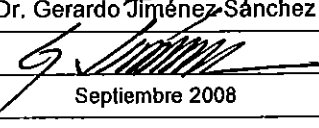
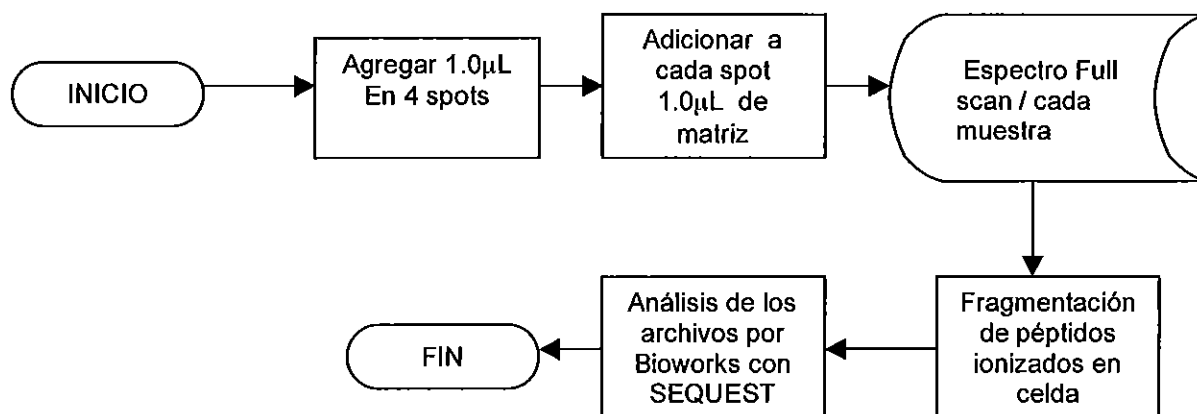
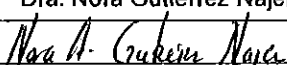
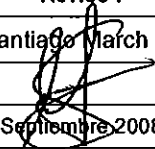
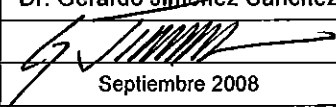
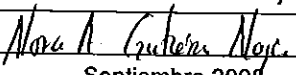
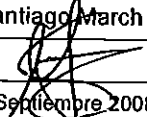
CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró :	Revisó :	Autorizó:
Nombre	Dra. Nora Gutiérrez Nájera	Dr. Santiago March Mifsut	Dr. Gerardo Jiménez Sánchez
Firma			
Fecha	Septiembre 2008	Septiembre 2008	Septiembre 2008

Diagrama de Flujo del procedimiento para identificación de proteínas por MALDI-LTQ-Orbitrap (Directa)



CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró :	Revisó :	Autorizó:
Nombre	Dra. Nora Gutiérrez Nájera	Dr. Santiago March Mílsul	Dr. Gerardo Jiménez Sánchez
Firma			
Fecha	Septiembre 2008	Septiembre 2008	Septiembre 2008

IX. Identificación de proteínas por Electrospray-LTQ/Orbitrap

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró :	Revisó :	Autorizó:
Nombre	Dra. Nora Gutiérrez Nájera	Dr. Santiago March Mifsut	Dr. Gerardo Jiménez Sánchez
Firma			
Fecha	Septiembre 2008	Septiembre 2008	Septiembre 2008

Descripción del procedimiento identificación de proteínas por Electrospray-LTQ-Orbitrap

Especificación de la muestra.-

La muestra debe estar en solución acuosa o en un buffer con bajo contenido de sales
 La muestra se inyecta a un sistema cromatográfico de nanoHPLC el cual cuenta con un cartucho de preconcentración

Reactivos.-

- Acetonitrilo grado HPLC (ACN)
- Agua grado HPLC (H₂O)
- Ácido Fórmico (AF)

Equipo. NanoHPLC acoplado a LTQ-Orbitrap

Soluciones.-

ACN (0.1% AF)

H₂O (0.1% AF)

Procedimiento.

1. Se permite que la muestra sea preconcentrada y desalada en el cartucho del sistema cromatográfico

2. Se aplica un gradiente similar al siguiente y se van adquiriendo los datos de los péptidos conforme van eluyendo de la columna nanoHPLC

Tiempo (min)	% ACN (0.1%) TFA
1	2
16	40
21	80
26	80
30	2

Para cada péptido la secuencia experimental es:

3. Obtener el espectro de alta resolución con el analizador Orbitrap en un experimento de "full scan"
4. Del espectro anterior se seleccionan las 10 señales más importantes y para cada péptido se lleva a cabo una fragmentación en la trampa lineal de iones.
5. Analizar los archivos para cada muestra por medio de Bioworks con el algoritmo SEQUEST

TERMINA PROCEDIMIENTO

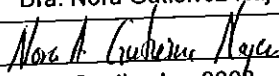
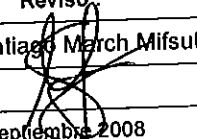
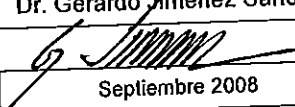
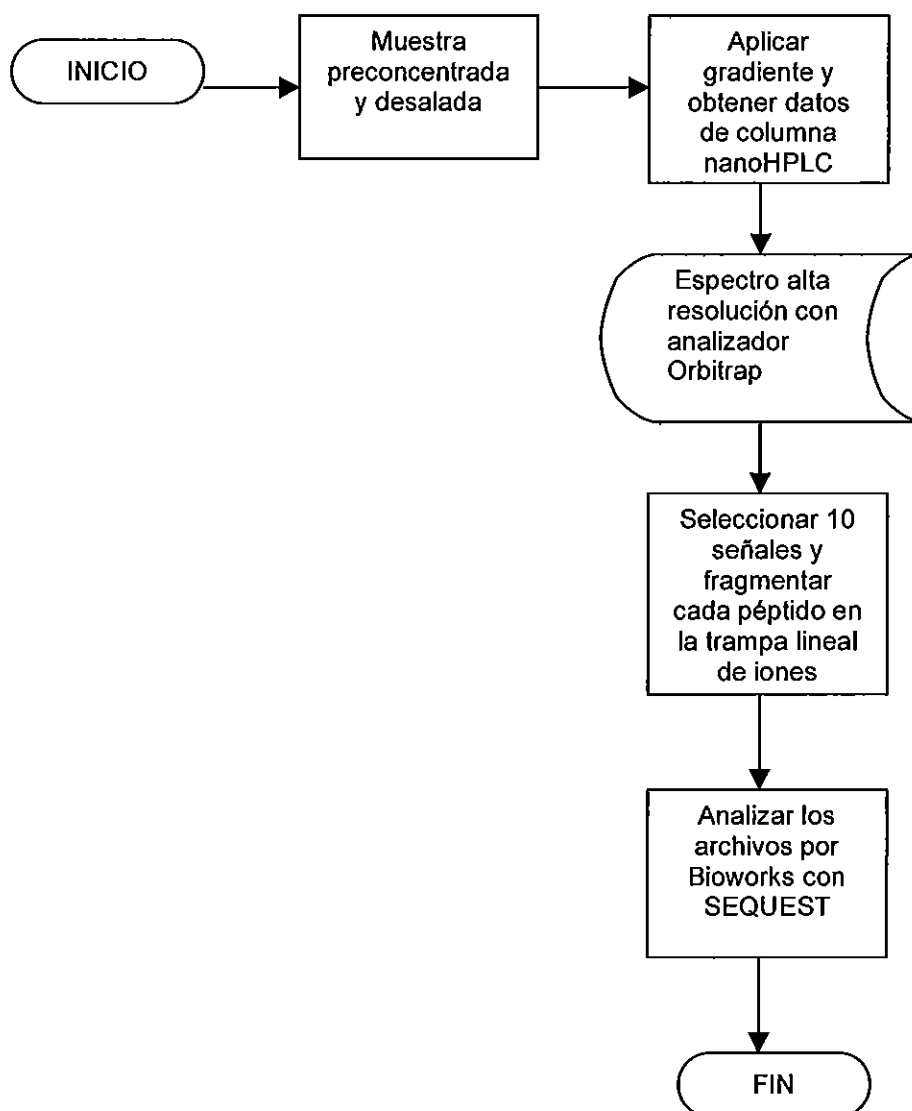
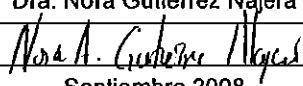
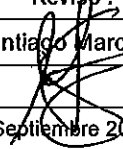
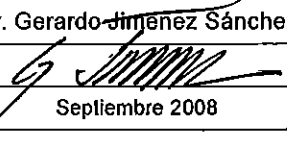
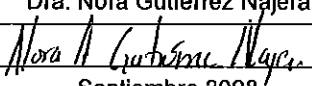
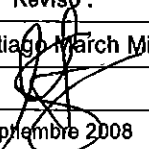
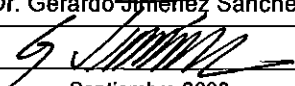
CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró :	Revisó :	Autorizó :
Nombre	Dra. Nora Gutiérrez Nájera	Dr. Santiago March Mifsut	Dr. Gerardo Jiménez Sánchez
Firma			
Fecha	Septiembre 2008	Septiembre 2008	Septiembre 2008

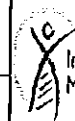
Diagrama de Flujo del procedimiento identificación de proteínas por Electrospray-LTQ-Orbitrap



CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró :	Revisó :	Autorizó:
Nombre	Dra. Nora Gutiérrez Nájera	Dr. Santiago March Milsut	Dr. Gerardo Jiménez Sánchez
Firma			
Fecha	Septiembre 2008	Septiembre 2008	Septiembre 2008

X. Digestión de proteínas a partir de gel

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró :	Revisó :	Autorizó:
Nombre	Dra. Nora Guliérrez Nájera	Dr. Santiago March Mifsut	Dr. Gerardo Jiménez Sánchez
Firma			
Fecha	Septiembre 2008	Septiembre 2008	Septiembre 2008

**Descripción del procedimiento digestión de proteínas a partir de gel**

Soluciones de digestión de proteínas:

1. Acetonitrilo 100%

2. Acetonitrilo 50%

$$C_1 V_1 = C_2 V_2$$

$$V_1 = \frac{C_2 V_2}{C_1}$$

$$V_1 = \frac{(50\%) (150 \text{ mL})}{100\%}$$

$$V_1 = 75 \text{ mL ACN} + 75 \text{ mL H}_2\text{O miliQ}$$

3. Bicarbonato de amonio ((NH₄HCO₃) 50 mMDisolver 0.19765 g de bicarbonato de amonio en 59 mL de H₂O miliQ

$$M = \frac{W}{(PM) (V)}$$

$$W = (M) (PM) (V)$$

$$W = (0.05 \text{ mol/L}) (79.06 \text{ g/mol}) (0.05 \text{ L})$$

$$W = 0.19765 \text{ g de NH}_4\text{HCO}_3 \text{ disolver con H}_2\text{O miliQ en un volumen de 50 mL}$$

4. Acetonitrilo 50% - NH₄HCO₃ 50 mMDisolver 0.19765 g de NH₄HCO₃ en 50 mL de acetonitrilo al 50%

$$M = \frac{W}{(PM) (V)}$$

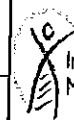
$$W = (M) (PM) (V)$$

$$W = (0.05 \text{ mol/L}) (79.06 \text{ g/mol}) (0.05 \text{ L})$$

$$W = 0.19765 \text{ g de NH}_4\text{HCO}_3 \text{ disolver con ACN 50\% en un volumen de 50 mL}$$

CONTROL DE EMISIÓN

	Elaboró:	Revisó:	Autorizó:
Nombre	Dra. Nora Gutiérrez Nájera	Dr. Santiago March Mifsut	Dr. Gerardo Jiménez Sánchez
Firma	<i>Nora A. Gutiérrez Nájera</i>	<i>Santiago March Mifsut</i>	<i>Gerardo Jiménez Sánchez</i>
Fecha	Septiembre 2008	Septiembre 2008	Septiembre 2008

**Notas de procedimiento:**

Los volúmenes utilizados en el protocolo son para una banda o mancha de proteína, por lo que estos deben ajustarse proporcionalmente al número de muestras cortadas del gel.

En experimentos con ESI no es necesario llevar a cabo el procedimiento de limpieza de las muestras con ZipTip, como en el caso de MALDI.

5. Solución de tripsina 25 ng/μL

Agregar 175 μL de NH_4HCO_3 50 mL a un stock de 200 n mol//μL

Trypsin Gold, MS Grade (100 ng)

100 ng = 100,000 ng

$$\frac{100,000\text{ng}}{X} = 200 \text{ ng}/\mu\text{L}$$

X

$$X = 500 \mu\text{L}$$

6. Buffer de extracción 50% (v/v) acetonitrilo, 5% (v/v) ácido fórmico

Mezclar 35 mL de acetonitrilo + 2.5 mL de ácido fórmico. Aforar a 50 mL con H_2O miliQ

$$\%V/V = V_{\text{soluta}} / V_{\text{solución}} \times 100$$

$$V_{\text{soluta}} = (\%V/V) (V_{\text{soluc}}) / 100$$

$$V_{\text{soluta}} = (5\%)(50\text{mL}) / 100$$

$$V_{\text{soluta}} = 2.5\text{mL de Ac. Formico}$$

$$V_{\text{soluta}} = (\%V/V) (V_{\text{soluc}}) / 100$$

$$V_{\text{soluta}} = (50\%) (50\text{mL}) / 100$$

$$V_{\text{soluta}} = 25\text{mL HAc.}$$

Procedimiento. Digestión de proteínas a partir del gel

1. Cortar las bandas o manchas de proteínas (aproximadamente 1mm^3 o 2mm^3 con la punta de una micropipeta, colocarlos en tubos eppendorf y remover el exceso de líquido.

CONTROL DE EMISIÓN

	Elaboró :	Revisó :	Autorizó:
Nombre	Dra. Nora Gutiérrez Najera	Dr. Santiago March Mifsut	Dr. Gerardo Jiménez Sánchez
Firma	<i>Nora A. Gutiérrez Najera</i>	<i>[Firma]</i>	<i>[Firma]</i>
Fecha	Septiembre 2008	Septiembre 2008	Septiembre 2008

SALUD SECRETARÍA DE SALUD	MANUAL DE PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN UNIDAD DE PROTEÓMICA MÉDICA	 Instituto Nacional de Medicina Genómica MEXICO	Código: Rev. Hoja: 61 de 70
--	---	---	-----------------------------------

2. Agregar 500µL de la solución acetonitrilo 50% - NH ₄ HCO ₃ 50 mM a cada corte de gel e incubar a 50°C durante 5 minutos.
3. Eliminar el sobrenadante y repetir el paso anterior hasta limpiar el Coomassie de la muestra (es recomendable dar vortex después de agregar la solución para evitar que los pedazos de gel se adhieran al tubo)
4. Agregar 100µL de acetonitrilo al 100% y dejar deshidratando las piezas de gel por 5 minutos a temperatura ambiente (Las piezas estarán deshidratadas cuando se tornen de un color blanco opaco y su tamaño se haya reducido significativamente)
5. Remover el sobrenadante y secar completamente las piezas del gel a temperatura ambiente (tubo destapado pero cubierto con un kimwipes para evitar contaminación)
6. Añadir 15µL de la solución de tripsina (25ng/µL) y dejar que las piezas de gel se rehidraten por aproximadamente 10 minutos mezclando ocasionalmente con vortex. Es importante que la cantidad de tripsina agregada sea suficiente para cubrir los pedazos de gel
7. Remover el excedente de solución de tripsina y añadir 20/µL de bicarbonato de amonio 50 mM (o un volumen suficiente para cubrir el gel hidratado) Llevar a cabo la reacción de digestión durante toda la noche a 37°C (aproximadamente 12 h)
8. Añadir 20/µL de bicarbonato de amonio 50mM a la digestión e incubar la muestra por 10 minutos mezclando ocasionalmente con vortex. Bajar la muestra al fondo centrifugando por 30 segundos. Colectar el sobrenadante cuidadosamente con la punta de una pipeta y transferirlo a un tubo de centrifuga nuevo de 0.5 ml.
9. Añadir 20µL de solución de extracción a las piezas de gel e incubar la muestra por 10 minutos mezclando ocasionalmente con vortex. Bajar la muestra al fondo del tubo centrifugando por 30 segundos. Colectar el sobrenadante cuidadosamente con la punta de una pipeta y combinar con el extracto anterior.
10. Añadir otros 20µL de solución de extracción a las piezas de gel e incubar la muestra por 10 minutos mezclando ocasionalmente con vortex. Bajar la muestra al fondo del tubo centrifugando por 30 segundos. Colectar el sobrenadante cuidadosamente con la punta de la pipeta y combinar con el extracto anterior
11. Reducir el volumen del extracto a 20µL evaporando en una centrifuga con vacio a temperatura ambiente. No dejar secar completamente
12. Ajustar el volumen de la muestra a 20µL con ácido acético al 1% solo en caso necesario
Termina procedimiento

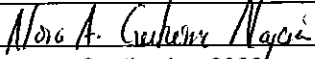
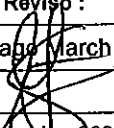
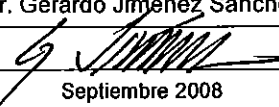
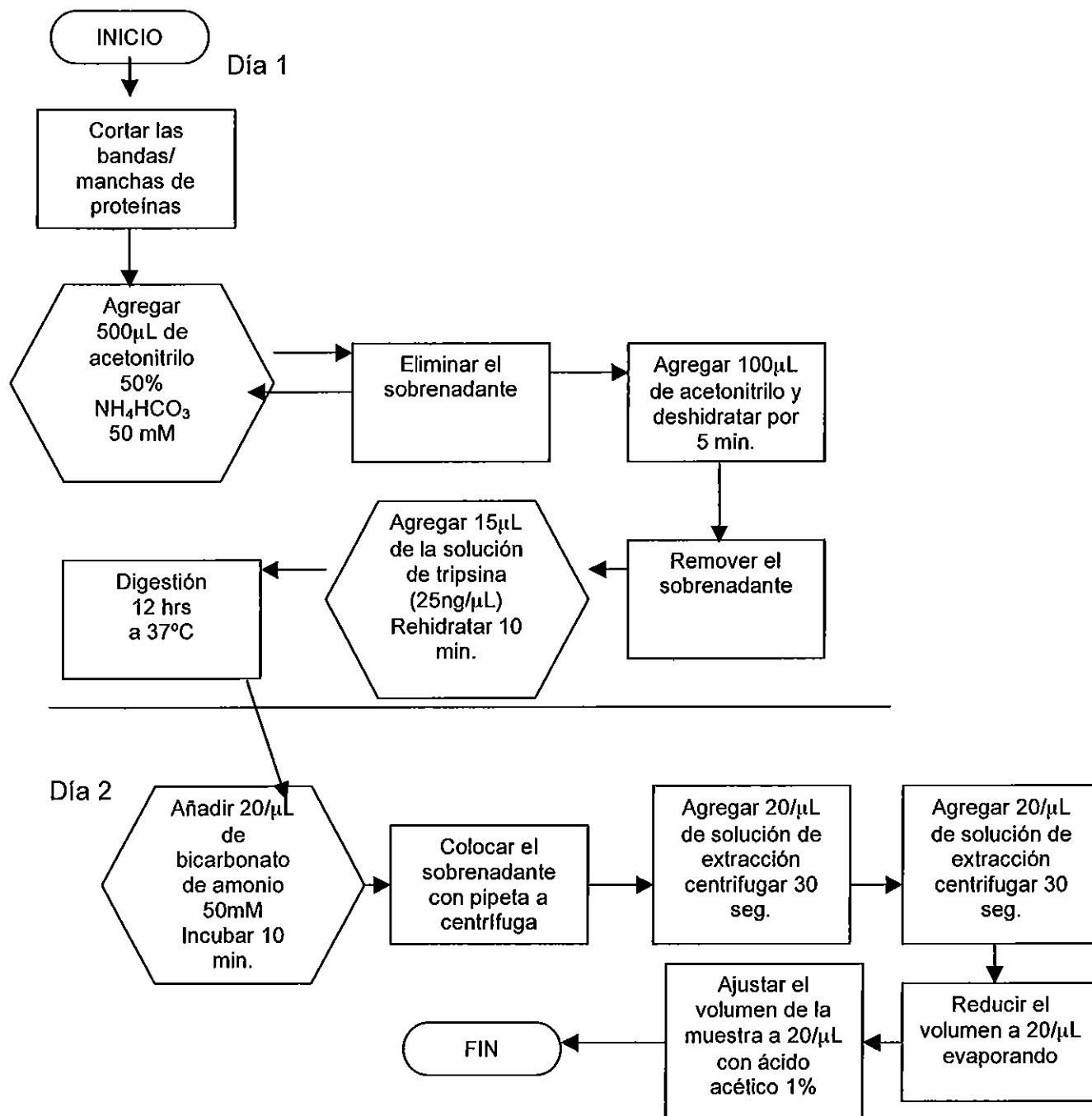
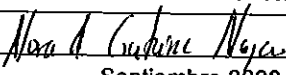
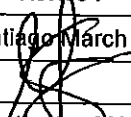
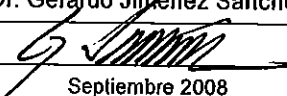
CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró :	Revisó :	Autorizó:
Nombre	Dra. Nora Gutiérrez Nájera	Dr. Santiago March Mifsut	Dr. Gerardo Jiménez Sánchez
Firma			
Fecha	Septiembre 2008	Septiembre 2008	Septiembre 2008

Diagrama de Flujo del procedimiento Digestión de proteínas a partir del gel



CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró :	Revisó :	Autorizó:
Nombre	Dra. Nora Gutiérrez Nájera	Dr. Santiago March Miñut	Dr. Gerardo Jiménez Sánchez
Firma	<i>Nora A. Gutiérrez Nájera</i>	<i>[Signature]</i>	<i>[Signature]</i>
Fecha	Septiembre 2008	Septiembre 2008	Septiembre 2008

XI. Desalación de péptidos utilizando Zip Tips

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró :	Revisó :	Autorizó:
Nombre	Dra. Nora Gutiérrez Nájera	Dr. Santiago March Mifsut	Dr. Gerardo Jiménez Sánchez
Firma			
Fecha	Septiembre 2008	Septiembre 2008	Septiembre 2008

Descripción del procedimiento para la desalación de péptidos utilizando Zip Tips

1. Soluciones de limpieza de péptidos y proteínas con Zip Tip (proceso de desalación):
 - Acetonitrilo 100%
 - Solución de equilibrio: Agua con ácido trifluoroacético 0.1% Agregar 50µL de TFA y aforar a 50 mL con H₂O miliQ
 - Solución de elución: acetonitrilo 50%-TFA 0.1% agregar 50µL de TFA y aforar a 50 mL con acetonitrilo al 50%
 - Solución de reconstitución de muestras: agua 95%-acetonitrilo 5% mezclar 47.5 mL de H₂O miliQ + 2.5 mL de acetonitrilo

Procedimiento . Acondicionamiento del Zip Tip

1. Use el zip Tip con una pipeta de un volumen que permita que toda la resina quede inmersa en las soluciones que se utilizan.
2. Tome el Zip Tip 10mL de la solución de reconstitución y en un vial de 500µL haga un ciclo de subir y expeler la solución al menos 10 veces. Al final deseche la solución. Repita el procedimiento con solución nueva.
3. Repita el proceso anterior pero utilizando la solución de equilibrio.
4. Transfiera 10 mL de la solución problema en un vial de 500µL. Repita el procedimiento del paso 1 con esta solución. Al menos 10 ciclos son los recomendados. Es importante que se haga lento a fin de tener un buen tiempo de contacto entre la resina y los péptidos o proteínas que se deseen retener.
5. A fin de eluir los péptidos retenidos, coloque entre 10 y 20µL de la solución de elución en un vial de 500µL y lleve a cabo el ciclo de inmersión-expeler la solución del Zip Tip. Repita el ciclo al menos 10 veces. La solución final en el vial contendrá los péptidos y/o proteínas.

Termino de procedimiento

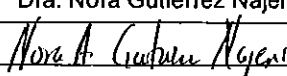
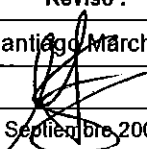
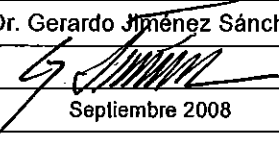
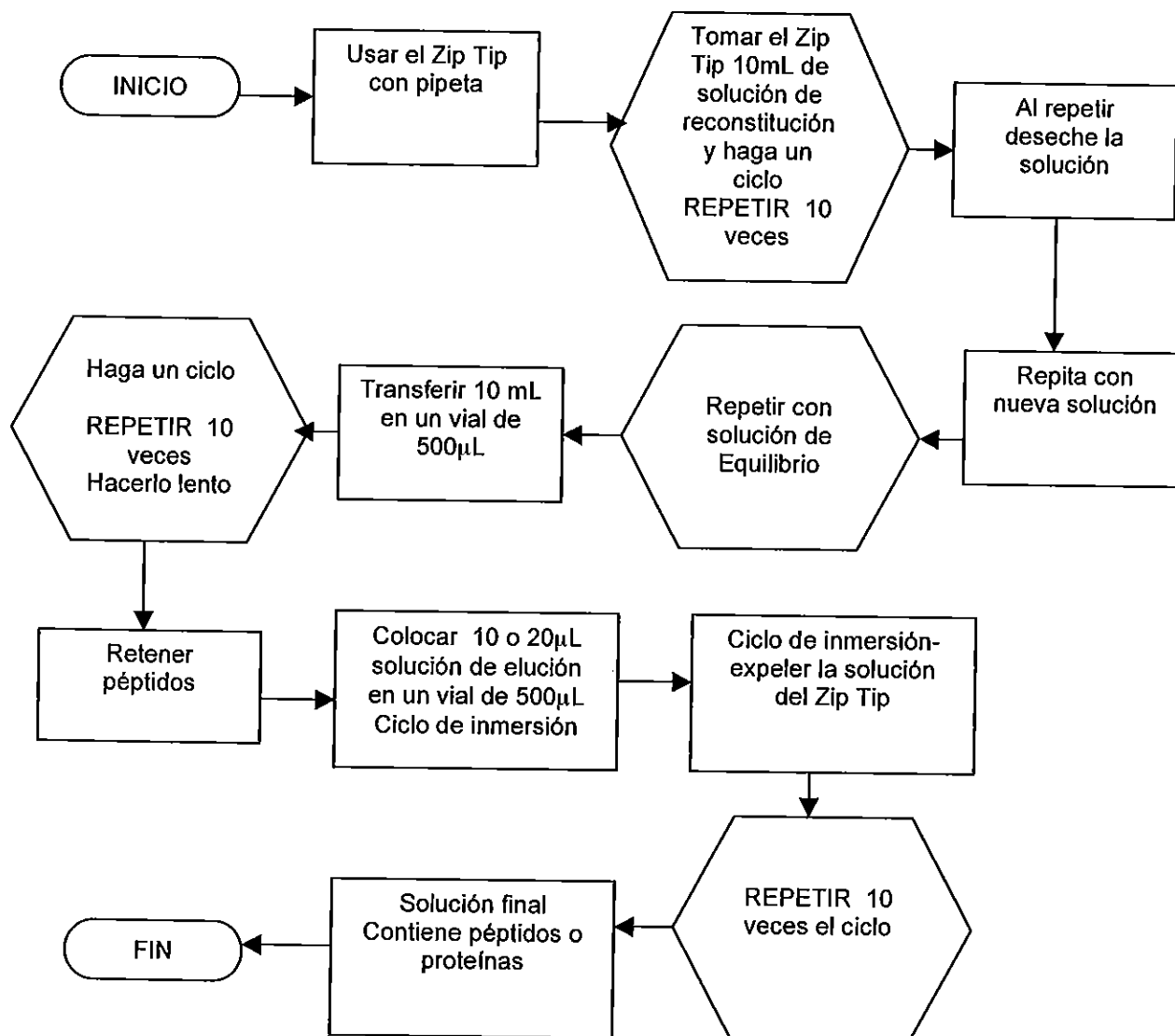
CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró :	Revisó :	Autorizó:
Nombre	Dra. Nora Gutiérrez Nájera	Dr. Santiago March Mifsut	Dr. Gerardo Jiménez Sánchez
Firma			
Fecha	Septiembre 2008	Septiembre 2008	Septiembre 2008

Diagrama de Flujo del procedimiento de Desalación de péptidos utilizando Zip Tips.



CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró :	Revisó :	Autorizó:
Nombre	Dra. Nora Gutiérrez Nájera	Dr. Santiago March Mifsut	Dr. Gerardo Jiménez Sánchez
Firma	<i>Nora A. Gutiérrez Nájera</i>	<i>[Signature]</i>	<i>[Signature]</i>
Fecha	Septiembre 2008	Septiembre 2008	Septiembre 2008

6.0 Documentos de referencia

Documentos	Código (cuando aplique)
Manual de Organización Específico del Instituto Nacional de Medicina Genómica autorizado por la Junta de Gobierno	No aplica
Norma oficial mexicana para la separación, envasado, almacenamiento, recolección, transporte, tratamiento y disposición final de los residuos peligrosos, biológicos- infecciosos. NOM 087-ECOL-SSA1 2002 D.O.F. 17-11-2003	No aplica
Manual técnico 2-D Electrophoresis Principles and Methods GE Healthcare	No aplica
Manual técnico Image Master 2D Platinum 6.0 User Manual (GE)	No aplica
Manual técnico DeCyder 2D Software, Version 6.5 User Manual	No aplica

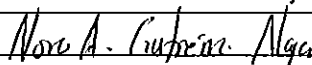
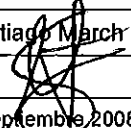
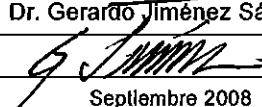
7.0 Registros

Registros	Tiempo de conservación	Responsable de conservarlo	Código de registro o identificación única
Formato para solicitud de análisis de muestras (F-P)	5 años	Unidad de Proteómica Médica	No aplica
Bitácora del servicio	1 año	Unidad de Proteómica Médica	No aplica
Resultados	6 meses	Unidad de Proteómica Médica	No aplica
Orden de pago	5 años	Unidad de Proteómica Médica	No aplica

8.0 Glosario

8.1 DNA: ácido desoxirribonucleico polinucleótido formado por la unión covalente entre unidades de desoxirribonucleótidos, compuestos de una base nitrogenada y una azúcar desoxirribosa. Contiene la información genética del organismo.

8.2 RNA: ácido ribonucleico, ácido nucleico formado por la unión covalente entre unidades de nucleótidos, compuestos de bases nitrogenadas y azúcares ribosa. A diferencia del DNA el RNA tiene como base nitrogenada el uracilo que sustituye a timina presente en el DNA

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró :	Revisó :	Autorizó:
Nombre	Dra. Nora Gutiérrez Nájera	Dr. Santiago March Mifsut	Dr. Gerardo Jiménez Sánchez
Firma			
Fecha	Septiembre 2008	Septiembre 2008	Septiembre 2008

8.3 Proteína: biomolécula formada por la polimerización de aminoácidos.

8.4 Proteoma: conjunto de proteínas que conforman un organelo, célula, órgano u organismo en un tiempo y condiciones dadas.

8.5 Paquete de cuantificación 2D-Quant: es un paquete de reactivos cuyo método colorimétrico permite la determinación de la concentración de proteínas en muestras que será analizadas por electroforesis.

8.6 Paquete de cuantificación RC DC Protein Assay Bio-Rad: paquete de reactivos cuyo método de tipo colorimétrico (basado en el método de Lowry) permite la cuantificación de proteínas. Es un método compatible con agentes reductores y detergentes que se encuentre presentes en la muestra de proteína.

8.7 Bitácora: libro de registro de procesos técnicos que se realizan en los proyectos de investigación

8.8 Bitácora de muestra: Se ingresa y se define el número y tipo de muestra así como el número de folio asignado internamente en el Unidad;

8.9 Bitácora por investigador responsable del proyecto: Las bitácoras se llevarán por investigador responsable de proyecto, registrándose en ella todo lo relacionado a los proyectos bajo su responsabilidad. Esta bitácora abarcará todos los experimentos que se realicen en la Unidad de Proteómica (separaciones, espectometría de masas, validación, etc.);

8.10 Bitácora para uso de los técnicos: Cada técnico adscrito a la Unidad de Proteómica Médica, tendrá su propia bitácora donde anotará estandarizaciones y procesos o proyectos piloto, tanto externos como internos;

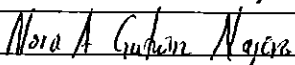
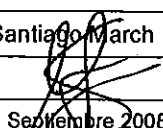
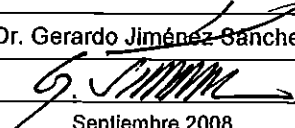
8.11 Bitácora para uso de equipo: En esta bitácora se anota el usuario del equipo, con los correspondientes datos de uso, fecha, ensayos, hora. Es estrictamente necesario anotar los datos solicitados en las bitácoras de uso del equipo, correspondientes, de otra forma no se permite el uso del equipo;

8.8 Usuario: persona que solicita los servicios de la Unidad

8.9 Fluóforos Cy2, Cy3 y Cy5: Reactivos de cianinas que se unen a las lisinas de las proteínas. Tienen propiedades fluorescentes.

8.10 Geles: Matriz gelatinosa de polímeros de acrilamida

8.11 Separación de Proteínas: Simplificación de la muestra compleja de proteínas totales en grupos o proteínas individuales.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró :	Revisó :	Autorizó:
Nombre	Dra. Nora Gutiérrez Nájera	Dr. Santiago March Mifsut	Dr. Gerardo Jiménez Sánchez
Firma			
Fecha	Septiembre 2008	Septiembre 2008	Septiembre 2008

8.12 Electroforesis SDS-PAGE: Migración en un campo eléctrico de proteínas en un gel en condiciones desnaturizantes (con detergente SDS).

8.13 Método TCA/ acetona: Precipitación de proteínas en solución utilizando el ácido tricloroacético y acetona

8.14 Método 2D Quant Kit: Paquete comercial de cuantificación de proteína (GE Healthcare)

8.15 Isoelectroenfoque: Electroforesis en gel con un gradiente de pH

8.16 DIGE: Differential in gel electrophoresis (electroforesis diferencial en gel).

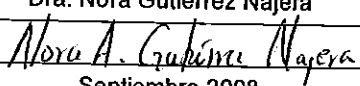
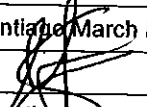
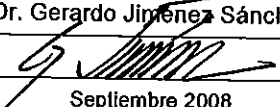
9.0 Cambios de esta versión

Número de Revisión	Fecha de la actualización	Descripción del cambio
No aplica	No aplica	No aplica

10.0 Anexos

10.1 Formato para solicitud de análisis de muestras

10.2 Instructivo para el llenado del Formato

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró :	Revisó :	Autorizó:
Nombre	Dra. Nora Gutiérrez Nájera	Dr. Santiago March Mifsut	Dr. Gerardo Jiménez Sánchez
Firma			
Fecha	Septiembre 2008	Septiembre 2008	Septiembre 2008



F - SPM - 1

Folio


 Formato de servicio
 de Proteómica Médica

 Unidad de
 Proteómica
 Médica
Datos del solicitante

Investigador responsable:

Cuenta usuario:

Institución:

Fax:

Laboratorio:

e-mail:

Dirección:

Fecha:

Teléfono:

Muestras provenientes de:

Tipo de servicio:

☐ Tejido☐ Separación 1D (SDS -PAGE)☐ Fluidos☐ Separación 1D (pI)☐ Células de cultivo☐ Separación 2D (pI y SDS -PAGE)☐ Otras (especificar): _____☐ Separación 1D no desnaturalizante☐ Método DIGECódigo de la muestra
(máximo 8 caracteres): _____

Espectrometría de masas

a) Identificación de proteínas a partir de muestras:

ESI - LTQ - Orbitrap

MALDI - TOF/TOF

MALDI - LTQ - Orbitrap

☐ CL☐ Directa☐ Directa☐ MUDPIT☐ CLb) ☐ Medición de m/zc) ☐ Separación cromatográfica de muestras (vía HPLC, fase: _____)d) ☐ Mapeo fosfopéptidos (Ti 0, - IMAC, CL - EM / EM)

Observaciones:

Firma del investigador responsable:

Firma de autorización

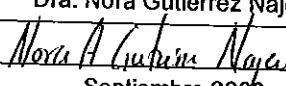
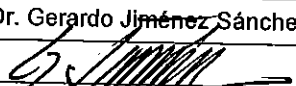
* Fuente biológica o clínica

CONTROL DE EMISIÓN

	Elaboró :	Revisó :	Autorizó:
Nombre	Dra. Nora Gutiérrez Nájera	Dr. Santiago March Mifsut	Dr. Gerardo Jiménez Sánchez
Firma	<i>Nora A. Gutiérrez Nájera</i>	<i>[Firma]</i>	<i>[Firma]</i>
Fecha	Septiembre 2008	Septiembre 2008	Septiembre 2008

Instructivo para el llenado del Formato SMP-1
Unidad de Proteómica Médica

No.	Concepto	Actividad
1	Folio	Anotar el número de folio asignado en la Unidad
2	Investigador responsable	Anotar el nombre completo del investigador responsable del proyecto, que solicita el servicio
3	Cuenta usuario	Anotar el número asignado de cuenta del usuario que le proporciona el INMEGEN
4	Fax	Anotar el número de Fax del solicitante
5	Institución	Anotar el nombre completo de la Institución solicitante
6	Laboratorio	Anotar el nombre del Laboratorio al que pertenece el Investigador responsable
7	Dirección	Anotar la Dirección en la cual se ubica la Institución solicitante
8	Teléfono	Anotar el número telefónico institucional del solicitante
9	e-mail	Anotar la dirección electrónica del solicitante
10	Fecha	Anotar la fecha en la que se hace la solicitud
11	Muestra proveniente de:	Anotar la fuente biológica o clínica de la muestra; pudiendo ser: tejido, fluido, células de cultivo y otros, en este último se especifica
12	Tipo de servicio	Marcar con una "X" el tipo de servicio que requiere: separación 1D (SDS-PAGE); separación 1D (pl); separación 2D (pl y SDS- PAGE); separación 1D no desnaturalizante; método DIGE
13	Código de muestra (8 caracteres máximo)	Anotar el código que asigne el solicitante a la muestra este debe ser de 8 caracteres máximo
14	Espectrometría de masas: a) Identificación de proteínas a partir de muestras:	Seleccionar la técnica / equipo: ESI-LTQ-Orbitrap: marcar con una "X" si se requiere CL (Cromatografía de líquidos); MUDPIT (Cromatografía en doble dimensión)
		Seleccionar la técnica / equipo MALDI-TOF/TOF: marcar con una "X" si se requiere Directa; CL (Cromatografía de líquidos)
		Seleccionar la técnica / equipo MALDI-LTQ-Orbitrap: Directa
15	b) Medición de m/z	Seleccionar con una "X" si se requiere relación masa/ carga
16	c) Separación cromatográfica de muestras (vía HPLC, fase:)	Seleccionar con una "X" si se requiere cromatografía de líquidos de alta resolución
17	d) Mapeo fosfopéptidos (Ti O2-IMAC, CL – EM/EM)	Seleccionar con una "X" si se requiere: óxido de titanio, Inmuno afinidad de metal; cromatografía de líquidos, masas.
18	Observaciones	Anotar cualquier observación que se requiera para que la solicitud sea mas clara, de acuerdo a la plática con el solicitante.

CONTROL DE EMISIÓN			
	Elaboró :	Revisó :	Autorizó:
Nombre	Dra. Nora Gutiérrez Nájera	Dr. Santiago March Mifsut	Dr. Gerardo Jiménez Sánchez
Firma			
Fecha	Septiembre 2008	Septiembre 2008	Septiembre 2008