

PLATAFORMA PROTEÒMICA

PE/IdISPa/PT-PROT-1.001_TYP-v01

PROCEDIMIENTO DE MANEJO DEL ESCÀNER DE FLUORESCENCIA TYPHOON FLA 9500

Revisión nº: **1**

Fecha de emisión:

Copia nº:

Realizado:	Revisado:	Aprobado:
Fdo.	Fdo.	Fdo.
Fecha:	Fecha:	Fecha:

ÍNDICE

- 1. OBJETIVO**
- 2. ALCANCE**
- 3. DEFINICIONES**
- 4. PROCEDIMIENTO**
 - 4.1. Descripción equipo*
 - 4.2. Escaneado*
 - 4.3. Análisis de las muestras*
 - 4.4. Limpieza del equipo*
- 5. REFERENCIAS**
- 6. ANEXOS**

1. OBJETIVO

El objetivo de este documento es definir el procedimiento de utilización del escáner de fluorescencia Typhoon FLA 9500 para todos los usuarios del equipamiento de proteómica autorizados del Instituto de Investigación Sanitaria de Palma (IdISPa).

2. ALCANCE

Este procedimiento es de aplicación para personal de laboratorio experto en el manejo de este aparato y que cumplan los criterios según los puntos 7.2 y 7.3. (uso y formación de procedimiento descripción de la plataforma). En resumen, debe haber recibido formación específica por parte del técnico de soporte de la plataforma.

3. DEFINICIONES

Fluorocromo o marcador fluorescente:

4. PROCEDIMIENTO

4.1. Descripción equipo

El equipo Typhoon FLA 9500 es un escáner basado en láseres ideal para entornos multiusuario. Sus aplicaciones incluyen ensayos cuantitativos de Western blots, fluorescencia multiplex, y marcajes con radioisótopos así como digitización de tinciones colorimétricas.

El sistema dispone de tres láseres de 473 nm, 532 nm y 635 nm , dos detectores tipo PMT (tubo fotomultiplicador, el Ch2 es de alta sensibilidad al rojo e infrarrojo) y una resolución de hasta 25 µm.

Imagen del Sistema:

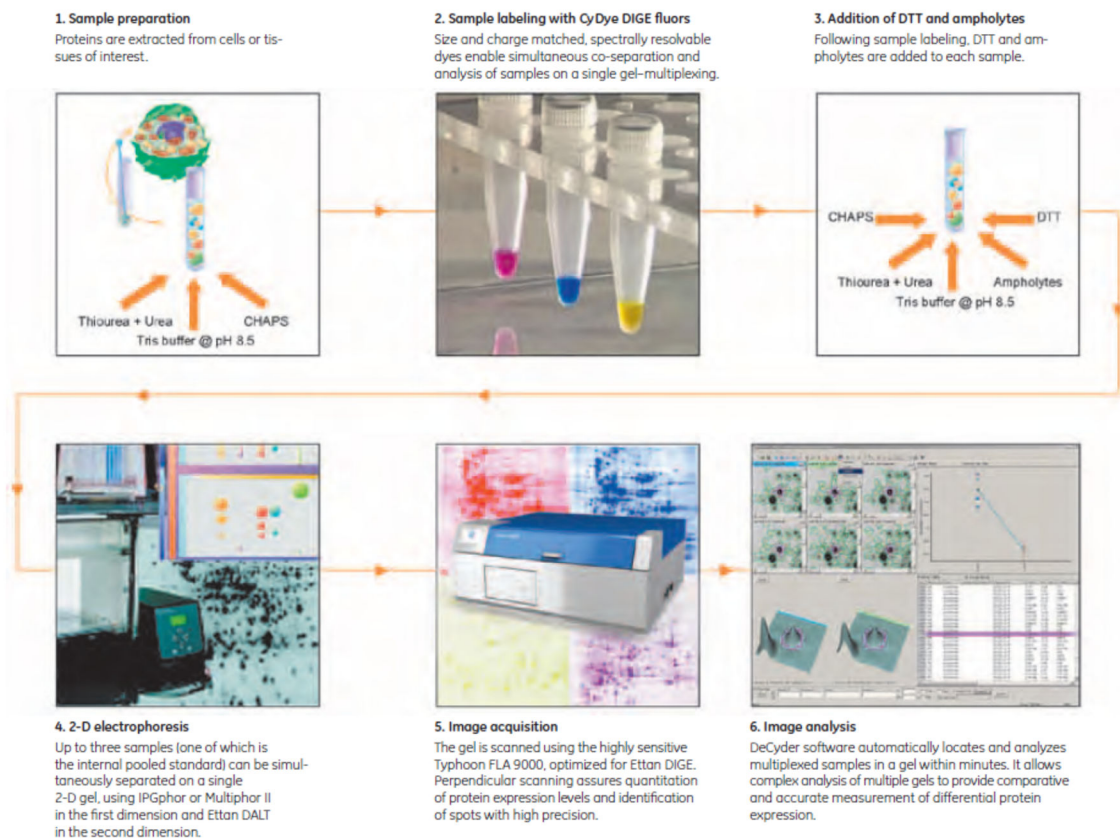


Los filtros disponibles, con sus características y los fluorocromos correspondientes aparecen en la siguiente tabla:

Table 2. Emission filters

Filter type	Wavelength range (nm)	Detection examples
IP	BP390	Phosphorimaging
LPB (510LP)	≥ 510	Cy2, SYBR™ Green, FAM™, FITC, Alexa Fluor™ 488, SYPRO™ Ruby, SYPRO Orange, GFP
BPB1 (530DF20)	520 to 540	Cy2 DIGE Fluor, ECL Plex Cy2
LPG (575LP)	≥ 575	Cy3, Deep Purple™, HEX, Alexa Fluor 532 and 555, SYPRO Red
BPG1 (570DF20)	560 to 580	Cy3 DIGE Fluor, ECL Plex Cy3
LPR (665 LP)	≥ 665	Cy5, Alexa Fluor 633, TOTO™ 3, DiD, Cy5 DIGE Fluor, ECL Plex Cy5
BPFR700 (R715)	713 to 726	Alexa Fluor 700, IRDye680, IRDye700
BPFR800 (R810)	814 to 826	Alexa Fluor 790, IRDye800

Esquema de un típico experimento 2D DIGE:



4.2. Escaneado

Encender el equipo (botón encendido delantero), se realizará una calibración. Abrir el software “Typhoon FLA9500 Control Software”, aparecerá la siguiente pantalla:



En la parte inferior, aparecen los filtros y láseres actualmente instalados. Si necesitamos cambiar filtros ("Filter module") o cambiar algún método iremos a la pestaña correspondiente (siempre con el responsable del equipo). Imagen cambio filtros:



Fig 2. Filters are easily exchanged by the user.

Una vez nos aseguramos de tener las condiciones adecuadas seleccionaremos el tipo de escaneo que queremos realizar: 2D DIGE (escaneo de geles en 2 dimensiones marcados con fluorescencia como Cy3, Cy5), Fluorescence (escaneo membranas o geles marcados con fluorescencia), Phosphorimaging (marcaje radioisótopos, no

disponible en nuestro sistema), Digitization (escaneo geles o membranas con marcaje colorimétrico) o Chemiluminescence (escaneo membranas con marcajes quimioluminiscentes, es preferible realizarlos con cámara ImageQuant LAS 4000). Colocaremos la muestra que queremos escanear en el “Stage” correspondiente:



Fig 4. (A) The Phosphor Stage, (B) Multi Stage, (C) Low Fluorescent Glass Plate Stage, and (D) Fluor Stage are designed to accommodate a variety of sample formats and imaging modes.

Phosphor Stage (A): no disponible (radioisótopos)

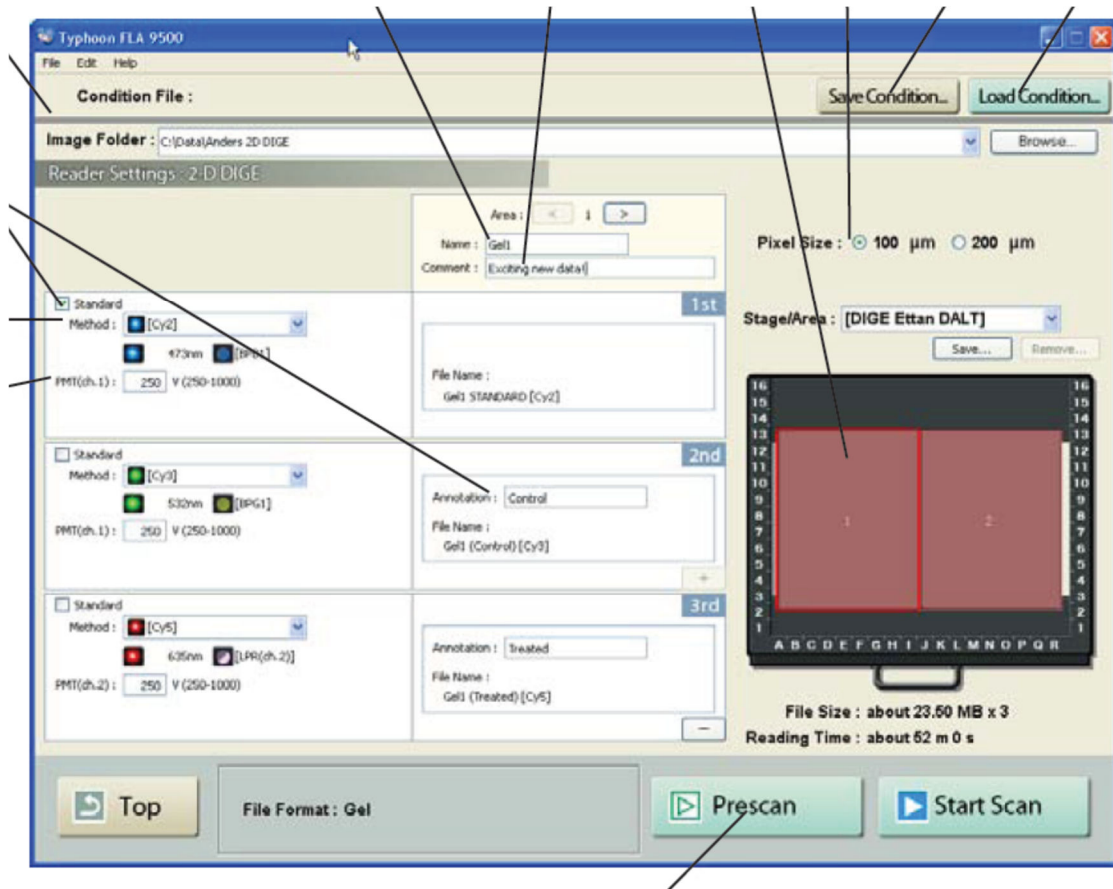
Multi Stage (B): más versátil, permite microplacas (96 pocillos, ej.), geles, etc.

Low Fluorescent Glass Plate Stage (C): 1 o 2 geles 2D DIGE

Fluor Stage (D): Membranas o geles para fluorescencia, digitalización o quimioluminiscencia.

Seleccionaremos las condiciones de escaneo: nombre archivo, área escaneo, tamaño del pixel (típicos 50 o 100 μm), fluorocromos y filtros, voltaje de PMT. Si queremos primero comprobar que las condiciones son las correctas, clicaremos “Prescan” (hace un preescaneo a 1000 μm), cuando ya las tengamos, clicaremos “Start Scan” y entonces realizará el escaneo definitivo.

Ejemplo escaneo 2D DIGE:



Ejemplo escaneo fluorescencia:

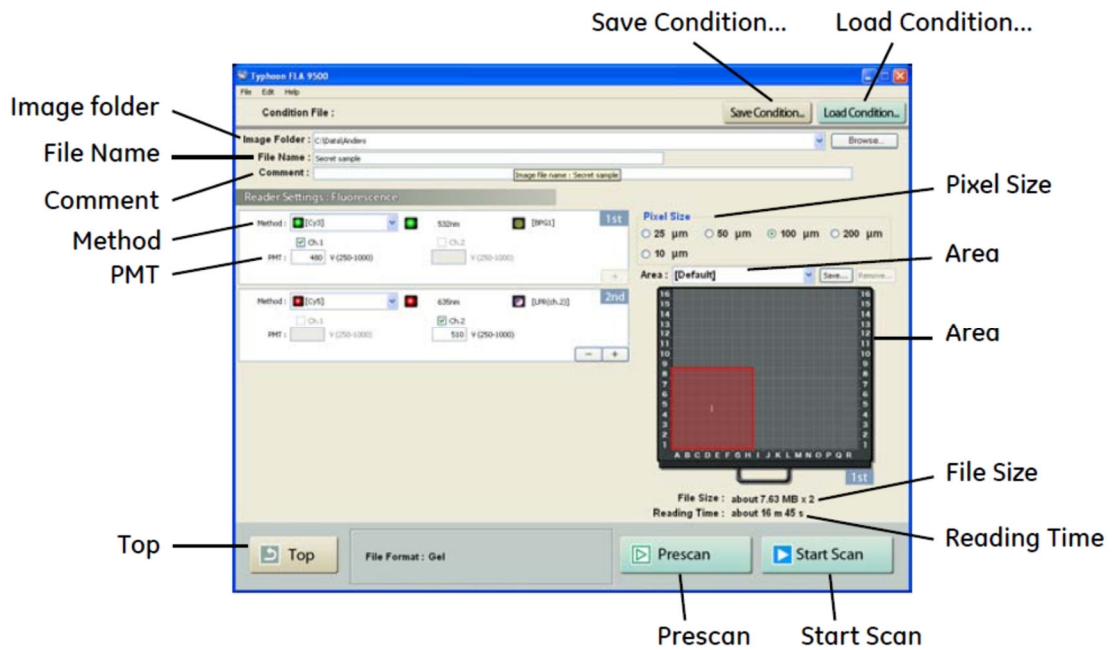
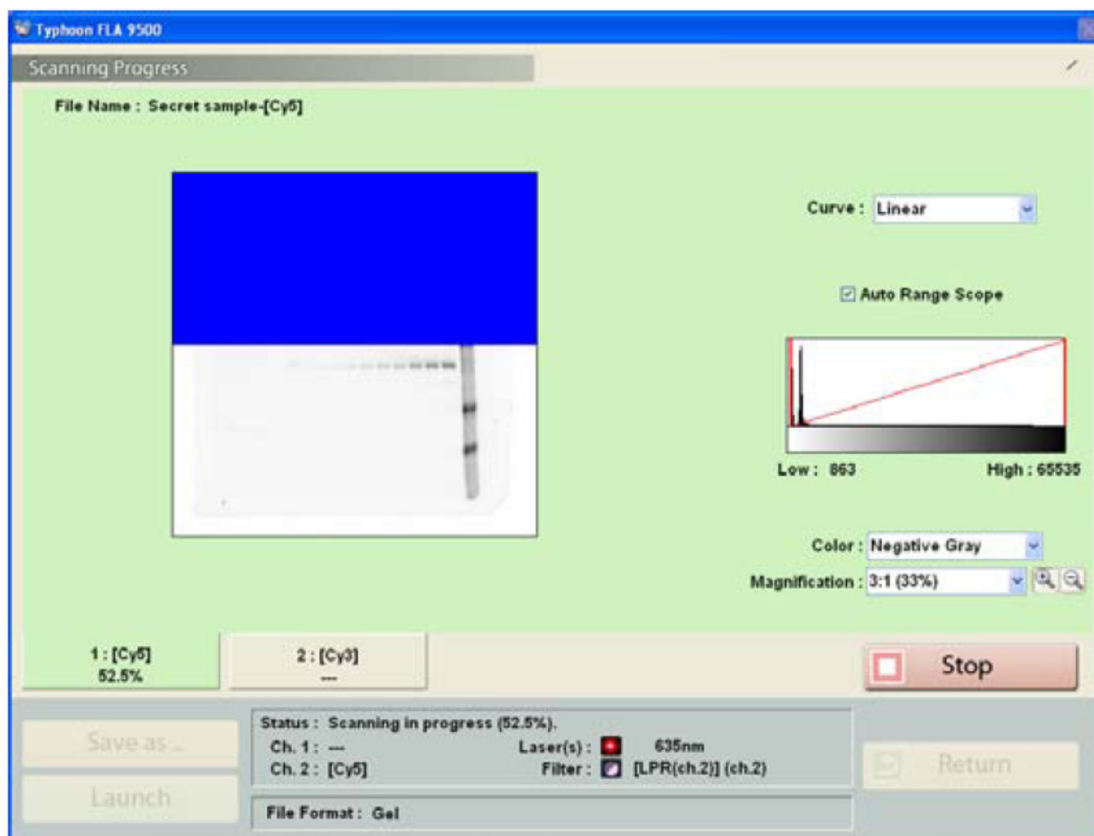
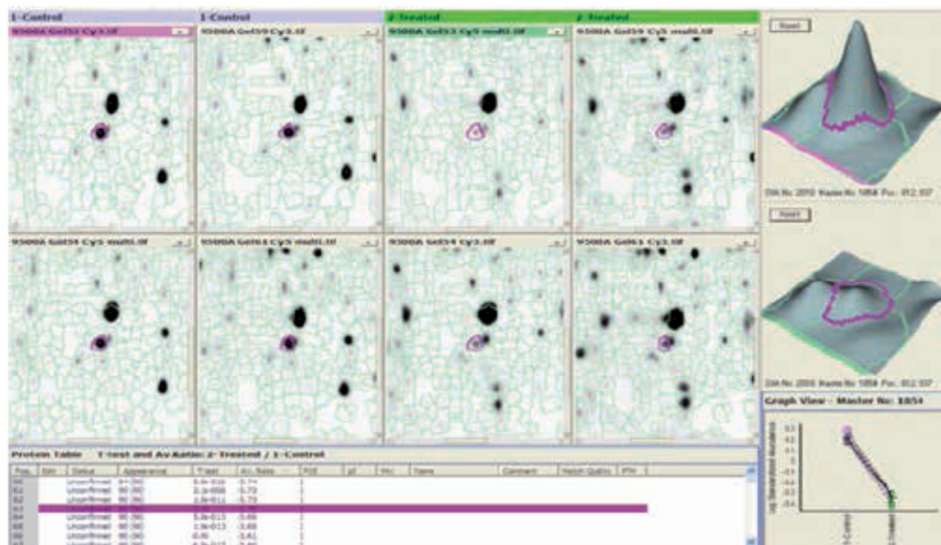


Imagen escaneo en curso:



4.3. Análisis de las muestras

El análisis de los resultados podemos realizarlo bien en el mismo ordenador o en la "Workstation" de proteómica usando los programas "ImageQuant TL" (Western blot, dot blots, user-defined...) o DeCyder 2D (DIGE, sólo en "Workstation")



4.4. Limpieza del equipo

Una vez acabado el escaneado, se limpiará el área de escaneo si procede (nunca con Etanol), se quitará el “Sample Stage” y se dejará el equipo preparado para el próximo uso.

5. REFERENCIAS

Para la elaboración de este procedimiento se han tenido en cuenta los criterios definidos desde las siguientes fuentes:

- Getting Started with Typhoon FLA 9500. Original instructions (GE Healthcare Life Sciences)
- Typhoon FLA 9500 User Manual (GE Healthcare Life Sciences)
- Typhoon FLA 9500 biomolecular imager (GE Healthcare Life Sciences)
- Seminario especialista aplicaciones (GE Healthcare Life Sciences)
- Manual de calidad IdISPa

6. ANEXOS

