

Mayo de 2016

# FICHAS TÉCNICAS, PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES Y METODOLOGÍAS OFRECIDAS A NUESTROS USUARIOS

SERVICIO CENTRAL DE APOYO A LA INVESTIGACIÓN (SCAI)

CAMPUS UNIVERSITARIO DE RABANALES  
EDF. RAMÓN Y CAJAL, TORRE ESTE  
14071-CÓRDOBA  
Tel: 957 218080  
E-mail: [scai@uco.es](mailto:scai@uco.es)  
[www.uco.es/servicios/scai](http://www.uco.es/servicios/scai)



SERVICIO CENTRAL  
DE APOYO A  
LA INVESTIGACIÓN



# Servicio Central de Apoyo a la Investigación

## **Área de BIOLOGÍA MOLECULAR**

Unidad de Genómica  
Unidad de Proteómica  
Unidad de Metabolómica  
Unidad de Bioinformática

## **Área de DETERMINACIÓN ESTRUCTURAL Y ANÁLISIS**

Unidad de Cromatografía y Espectrometría de Masas  
Unidad de Resonancia Magnética Nuclear (RMN)  
Unidad de Espectroscopia Fotoelectrónica de Rayos X (XPS)  
Unidad de Espectroscopia NIR/MIR

## **Área de MICROSCOPIA**

Unidad de Microscopía Electrónica de Barrido y Microanálisis  
Unidad de Microscopía Electrónica de Transmisión  
Unidad de Microscopía Confocal  
Unidad de Preparación de Muestras y Ultramicrotomía

## **Área de IMAGEN CIENTÍFICA**

Unidad de Fotografía Científica  
Unidad de Técnicas Geoespaciales

# Área de BIOLOGÍA MOLECULAR

## GENÓMICA

- Análisis de Fragmentos de ADN por electroforesis capilar
- Cuantificación y análisis de calidad de ADN, ARN y Proteínas.
- Determinación de polimorfismos de una sóla base (SNPs) mediante la técnica SNaPshot™
- Microarrays de ADN
- Open Array (QuantStudio 12K Flex Real –Time PCR)
- PCR a tiempo real
- Secuenciación de ADN “ Sanger”
- Secuenciación masiva (“NGS”)
- Muestreo de mutaciones mediante cromatografía líquida desnaturalizante de alto rendimiento ( D-HPLC)

## PROTEÓMICA

- Identificación, caracterización y cuantificación de péptidos y proteínas por técnicas de nanoHPLC-espectrometría de masas
- Identificación de proteínas por espectrometría de masas MALDI TOF-TOF

## METABOLÓMICA

- Determinación de compuestos orgánicos mediante HPLC-MS y compuestos orgánicos volátiles y semivolátiles mediante GC-MS

## BIOINFORMÁTICA

- aDNAseq: high-throughput ancient DNA sequencing
- DNA microarrays: quantification of gene expression
- RNAseq: whole transcriptome shotgun sequencing



## Análisis de Fragmentos de ADN por electroforesis capilar

### OBJETIVO

Determinación del tamaño de los fragmentos de ADN generados por PCR, ya sean repeticiones en tandem “VNTRs” principalmente “microsatélites” o “AFLPs” (polimorfismos de longitud de fragmentos amplificados), con el fin de identificar variedades y/o individuos (genotipado).

### ESTADO DEL ARTE

Mediante la técnica de genotipado de Análisis de Fragmentos basada en marcadores moleculares, se pueden visualizar uno o múltiples productos de PCR amplificados simultáneamente, obteniéndose de este modo patrones de bandas que pueden ser específicos para cada especie o que presenten variabilidad entre los individuos de una determinada especie.

El servicio se encarga de la etapa final de estas técnicas, la cual consiste en la determinación del tamaño de los fragmentos de ADN proporcionados por el usuario mediante electroforesis capilar y detección por láser. Los fragmentos de ADN van marcados mediante moléculas fluorescentes y la determinación del tamaño se realiza en relación a estándares internos de peso molecular que se añaden a las muestras antes de la electroforesis. Se pueden utilizar hasta 5 marcadores fluorescentes simultáneamente (uno de ellos reservado para el marcador de tamaños moleculares) y combinar fragmentos con tamaños esperados diferentes en la misma muestra, por lo que por cada capilar en una misma electroforesis se pueden analizar multitud de fragmentos.

### DISEÑO EXPERIMENTAL

**Equipamiento.** El equipo disponible es un ABI 3130XL Genetic Analyzer (16 capilares, 3130XL Data Collection v 3.0) en donde se realiza la electroforesis que separa los fragmentos en función de su tamaño y son detectados gracias a la fluorescencia que emiten los fluorocromos con los que están marcados durante la PCR, al ser excitados con un láser.

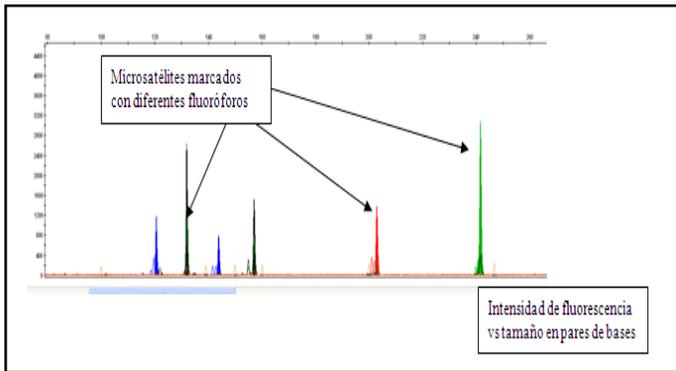
**Descripción del procedimiento:** Una de las principales ventajas de esta metodología es la detección multicolor. A continuación, se detallan algunos aspectos de utilidad a la hora de elegir un fluorocromo u otro para marcar las parejas de oligos de interés y las matrices con las que trabaja el equipo.

*Detección multicolor. Intensidad relativa de los fluorocromos más utilizados.*

Dyes	Max A (nm)	Max E (nm)	Intensidad Rel
5-FAM™	494	530	100
6-FAM™	494	522	100
JOE™	528	554	100
VIC®	538	554	100
HEX™	535	553	50
NED™	546	575	40
TAMRA/TAMRA™	560	582	25
PET®	558	595	25
ROX™	587	607	12
LIZ®	638	655	50

Matriz	Azul	Verde	Amarillo	Rojo	Naranja
D	6-FAM™	HEX™	NED™	ROX™	
F	5-FAM™	JOE™	NED™	ROX™	
G5	6FAM™	VIC®	NED™	PET®	LIZ®

Las muestras deben ser presentadas en placas con al menos 8-10  $\mu$ l de la/s reacción/es de PCR en la que se haya realizado el/los marcajes. Una vez las muestras son entregadas en la Unidad para su análisis, se realiza una electroforesis de prueba de las mismas para saber la dilución a la cual deben ser preparadas para una correcta lectura e interpretación de los datos (altura de picos/intensidad de fluorescencia) y dependiendo de los tamaños esperados se introducirá uno u otro patrón de bandas (Tamra 350; Rox 400; Rox 500; Rox 1000; Liz 120 y Liz 500). El programa utilizado para la interpretación de los resultados es GeneMapper v 4.0.



## APLICACIONES

La técnica de Análisis de Fragmentos se utiliza de forma rutinaria para determinar:

- Asociación de marcadores moleculares con caracteres de interés (QTLs).
- Identificación de estirpes, variedades o razas.
- Mapeo genómico y mejora genética.
- Análisis de la paternidad.
- Catalogación de bancos de germoplasma.
- Diagnóstico precoz de enfermedades genéticas.
- Investigación policial forense.

## REFERENCIAS

Life Technologies: <https://www.lifetechnologies.com/es/en/home/life-science/sequencing/fragment-analysis/fragment-analysis-fundamentals.html>



## Cuantificación y análisis de calidad de ADN, ARN y Proteínas.

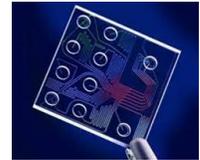
### OBJETIVO

Análisis de la calidad y/o cantidad de ADN, ARN y proteínas de una determinada muestra.

### ESTADO DEL ARTE

La tecnología de microfluidos utiliza una red de canales y pocillos que han sido grabados en vidrio (conocidos como chips). Estos chips sometidos a presión y a un campo eléctrico hacen que los volúmenes, tanto del polímero como de las muestras, migren de forma controlada a través de los canales.

La tecnología de chips permite la manipulación, mezcla, dilución, electroforesis y separación cromatográfica de muestras tanto de ADN, ARN como proteínas, utilizando volúmenes muy pequeños.



### DISEÑO EXPERIMENTAL

**Equipamiento.** El equipo disponible es un Bioanalyzer 2100 ( Agilent Technologies).

**Descripción del procedimiento:** Ya que en el equipo se pueden analizar muestras de ADN, ARN y Proteínas, el procedimiento para cada tipo de muestra es ligeramente diferente, al igual que los chips utilizados:

- ADN: El usuario debe entregar 2 µl de muestra en un tubo de PCR de 0.2 ml. El número de muestras que se pueden analizar simultáneamente también depende del chip específico que usemos, dependiendo de las características del análisis; por ejemplo, chips 7500: 12 muestras, chips de alta sensibilidad: 11 muestras.
- ARN: El usuario debe entregar 2 µl de muestra en un tubo de PCR de 0.2 ml. Se pueden analizar 12 muestras simultáneamente.
- Proteínas: El usuario debe entregar 5 µl de muestra en un tubo de PCR de 0.2 ml. Se pueden analizar 10 muestras simultáneamente.

En todos los tipos chips hay que preparar un gel que se introduce en los pocillos adecuados y se “ inyecta” en los canales para que posteriormente las muestras puedan ser separadas mediante electroforesis. Una vez que el gel ha polimerizado se procede a la carga de las muestras en el chip, que han sido preparadas según el tipo de muestra y análisis requerido.

La Unidad dispone de los siguientes tipos de chips:

ADN	ARN	PROTEÍNAS
DNA 7500	RNA 6000 Nano	Protein 230
DNA High sensitivity		Protein 80

En caso de necesitar un chip que no se encuentre en la tabla el usuario puede ponerse en contacto con la Unidad. La gama completa de chips puede ser consultada en la siguiente dirección:

<http://www.genomics.agilent.com/en/Bioanalyzer-TapeStation-/?pgid=AG-PG-1>

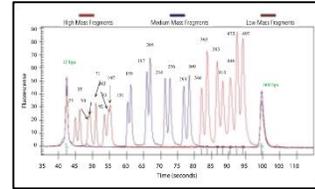
Los datos del chip se analizan con el programa específico suministrado con el equipo (Agilent 2100 expert) que genera un informe en formato PDF) que se envía por correo electrónico al usuario.

## APLICACIONES

---

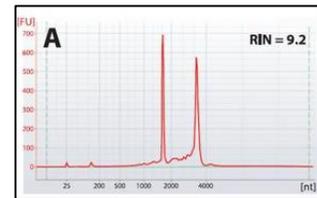
### ADN:

- Análisis de zonas de restricción digeridas por enzimas específicas.
- Análisis de productos de PCR.
- Análisis de expresión génica.
- Análisis de alimentos.
- Detección de GMO.
- Oncología.
- Investigación clínica.
- Análisis forense.



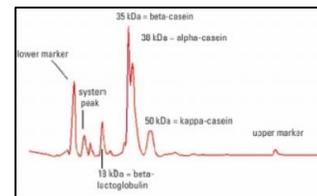
### ARN:

- Análisis de ARN total ( el más usado es el RNA Integrity Number : RIN)
- Detección de cantidades pequeñas de RNA total.
- Análisis de mRNA.
- Análisis de muestras marcadas con Cy5.



### POTEÍNAS:

- Expresión de proteínas.
- Análisis de la purificación de las muestras.
- Detección de proteínas de baja concentración.
- Análisis de anticuerpos.
- Cuantificación de proteínas.
- Análisis de alimentos.



## REFERENCIAS

---

<http://www.gene-quantification.de/Bioanalyzer-2100.pdf>

[https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/Public/G2946-90004\\_Vespucci\\_UG\\_eBook\\_\(NoSecPack\).pdf](https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/Public/G2946-90004_Vespucci_UG_eBook_(NoSecPack).pdf)

## Determinación de polimorfismos de una sólo base (SNPs) mediante la técnica SNaPshot™.

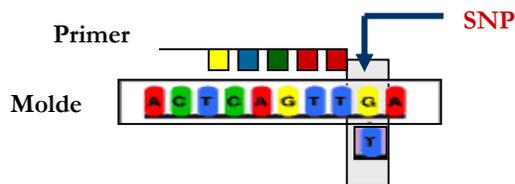
### OBJETIVO

Determinación y confirmación de hasta 10 SNPs conocidos de forma simultánea en una muestra de ADN.

### ESTADO DEL ARTE

Los SNPs son mutaciones consistentes en el cambio de un sólo nucleótido. Pueden encontrarse en regiones codificantes determinando el cambio de un aminoácido o bien determinar un cambio sinónimo, también pueden presentarse en regiones no codificantes. El genoma de la mayoría de los individuos de una especie es casi idéntico, más del 99%, la fuente de variabilidad genética más importante son los SNPs (por ejemplo, aproximadamente el 85% de la variabilidad humana está basada en la presencia de estos). Es por ello que hoy en día sean objeto de estudio tanto para su uso como marcadores genéticos como por su efecto biológico.

La técnica SNaPshot™ para determinación de SNPs se basa en el método de secuenciación enzimática de Sanger, con algunas variaciones, de ahí que esta técnica sea conocida como “Minisequenciación” además de como “Primer Extension Analysis”. Se basa en el uso de cebadores (*primers*) específicos adyacentes a la base a determinar.



La reacción de secuenciación se lleva a cabo sólo con los 4 didesoxinucleótidos marcados con fluorocromos diferentes. No hay dNTPs, lo que supone que la polimerasa sólo colocará el ddNTP marcado correspondiente a la base que queremos determinar. La detección de la base incorporada revela la presencia/ausencia de polimorfismo y el genotipo.

### DISEÑO EXPERIMENTAL

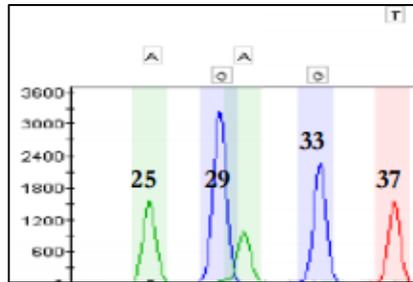
**Equipamiento.** El equipo disponible para la electroforesis y detección con láser es un secuenciador multicapilar ABI 3130 XL (Life Technologies). La reacción se lleva a cabo con el kit SNaPshot™ Multiplex (Life Technologies) en termocicladores PCR System 9700 de Applied Biosystems y T3 de Biometra.

**Descripción del procedimiento:** Las características del *primer* o cebador necesarias para poder llevar a cabo esta técnica son las siguientes:

- El *primer* debe ser diseñado para que termine justo en el extremo 5' del SNP, es decir, justo antes de la base a determinar.
- $T_m > 50^\circ\text{C}$  siempre que sea posible, para que la reacción sea más eficiente.
- Puede ser diseñado tanto en la cadena *forward* (directa) como en la *reverse* (reversa). Se recomienda chequear la secuencia en cualquier plataforma web para ver en qué dirección es más accesible el *primer* al SNP.
- Se debe chequear el *primer* para evitar la formación de dímeros, *hairpins*, etc...
- La longitud debe estar entre 20-30 nucleótidos y ser purificados mediante HPLC (sobre todo aquellos  $> 30$  nucleótidos).

Se puede llevar a cabo multiplex con *primers* que tengan  $T_m$  parecida. Éstos se diseñan con el mismo número de nucleótidos y la diferencia de longitud se consigue mediante la adicción de colas inespecíficas poliA-T en el extremo 5'. Se recomienda que los *primers* difieran entre sí al menos 4-6 nucleótidos.

El usuario ha de traer el fragmento de ADN donde desea determinar los SNPs amplificado y purificado. En la Unidad se lleva a cabo la reacción de SNaPshot™. Tras la reacción de minisequenciación, las muestras se purifican mediante ExoI-SAP y se cargan en los secuenciadores para la electroforesis. El programa utilizado para la interpretación de los resultados es GeneMapper v 4.0.



Ejemplo de búsqueda de 4 SNPs en un mismo producto de PCR

## APLICACIONES

---

La técnica de minisequenciación se utiliza de forma rutinaria para :

- Detección y confirmación de mutaciones conocidas (SNPs).
- Búsqueda de polimorfismo en poblaciones: genotipado de variedades.
- Diagnóstico de enfermedades.
- Medicina personalizada: diferente metabolización de fármacos.

## REFERENCIAS

---

<https://www.lifetechnologies.com/es/en/home/life-science/sequencing/dna-sequencing/snp-genotyping-variant-detection-sequencing/snp-genotyping-fragment-analysis.html>

## Microarrays de ADN

### OBJETIVO

El estudio de la secuencia de genes conocidos (estudios de SNPs, metilación, ChIP, CGH) y/o la determinación del nivel de transcritos (mRNA) de un gran número de genes simultáneamente para determinar cuáles se expresan en la célula bajo diferentes condiciones (estudio de expresión transcripcional).

### ESTADO DEL ARTE

La técnica trata de inmovilizar sobre soporte sólido de vidrio (un porta de microscopio convenientemente tratado para unión covalente con el ADN) y con una elevada densidad de integración (con una disposición regular y prefijada), ADN, ya sean oligos o ADN copia amplificado mediante PCR, dependiendo de las aplicaciones y de las técnicas de inmovilización del ADN. Sonda es el término que se utiliza para definir los fragmentos de ADN de secuencia conocida que se inmovilizan y que se emplearán luego para los ensayos de hibridación con el fin de identificar secuencias idénticas o similares en una mezcla compleja de ácidos nucleicos que constituyen la muestra. Se trata de una técnica basada en la clásica hibridación de ácidos nucleicos "Southern/Northern Blot", pero realizada a gran escala (se puede hibridar todo el genoma conocido de un organismo). El sistema de detección es de marcaje fluorescente de la muestra que hibrida, lo que requiere de un escáner (con un láser acoplado que lee diferentes longitudes de onda) para la visualización de los resultados de la hibridación. Los grandes volúmenes de información que se generan, necesitan ser gestionados con herramientas bioinformáticas.

### DISEÑO EXPERIMENTAL

**Equipamiento.** Son varios los equipos disponibles en la Unidad:

- Robot de Impresión por contacto Microgrid II-600 (BioRobotics) para la inmovilización de oligos y/o cDNAs con una densidad de hasta 10.000 sondas.
- Bioanalyzer 2100 (Agilent) para determinación del RIN de las muestras de RNA a hibridar.
- Plataforma comercial Agilent: Horno G2545A y Cámaras de Hibridación para arrays de oligos de Agilent.
- Plataforma comercial Affymetrix: Horno de Hibridación 645, Estación Fluidica 450 y Escáner 3000 7G para arrays de oligos Affymetrix.
- Escáner GenePix 4000B (Axon Instruments) con detector láser de 2 colores Cy-3 y Cy-5.

### Descripción del procedimiento:

**Impresión de oligos y/o cDNAs.** El usuario traerá el ADN a imprimir preparado según las especificaciones dadas por Corning (UltraGAPS Coated Slides, [www.corning.com/lifesciences](http://www.corning.com/lifesciences)) para una óptima impresión en sus cristales (normalmente se recomienda un volumen de 15-20µl a una concentración de 0,1mg/ml en 50% de DMSO). También deberá traer un fichero Excel donde aparezca por placa el nombre de cada muestra localizada en su pocillo según las especificaciones del Manual del Robot de Impresión Microgrid II que generará un fichero GAL necesario para que el software del escáner pueda luego relacionar los resultados de lectura de fluorescencia de cada punto con la muestra correspondiente. Igualmente, especificará el diseño deseado para la impresión del array, campos a imprimir, repeticiones, número de visitas, densidad, controles..., y el número de cristales que desea imprimir, para ello contará en todo momento con la colaboración del personal de la Unidad.

Con respecto a los microarrays comerciales, Agilent cuenta con arrays prediseñados de diversos organismos y para diversas aplicaciones. Todos presentan sondas sensibles y selectivas de 60 pb (60-mer) sintetizados *in situ* mediante la tecnología SurePrint. Además, la plataforma Agilent permite la síntesis de cualquier tipo de microarray adaptado a las necesidades particulares de cada proyecto de investigación (Custom Gene Expression Microarrays). Cuenta con 4 formatos de capacidad y densidad de sondas diferente (1x244K, 2x105K, 4x44K y 8x15K). Con respecto a los microarrays de Affymetrix, se obtienen mediante la síntesis de oligonucleótidos de 25-mer utilizando la técnica de fotolitografía sobre una superficie de cuarzo y cuentan también con diferentes formatos dependiendo de la cobertura del genoma a hibridar y de las

diferentes aplicaciones (3'Expression Array, Gene Array, Exon Array, Tilling Array, Promoter Arrays...), siendo de una alta reproducibilidad y exactitud.

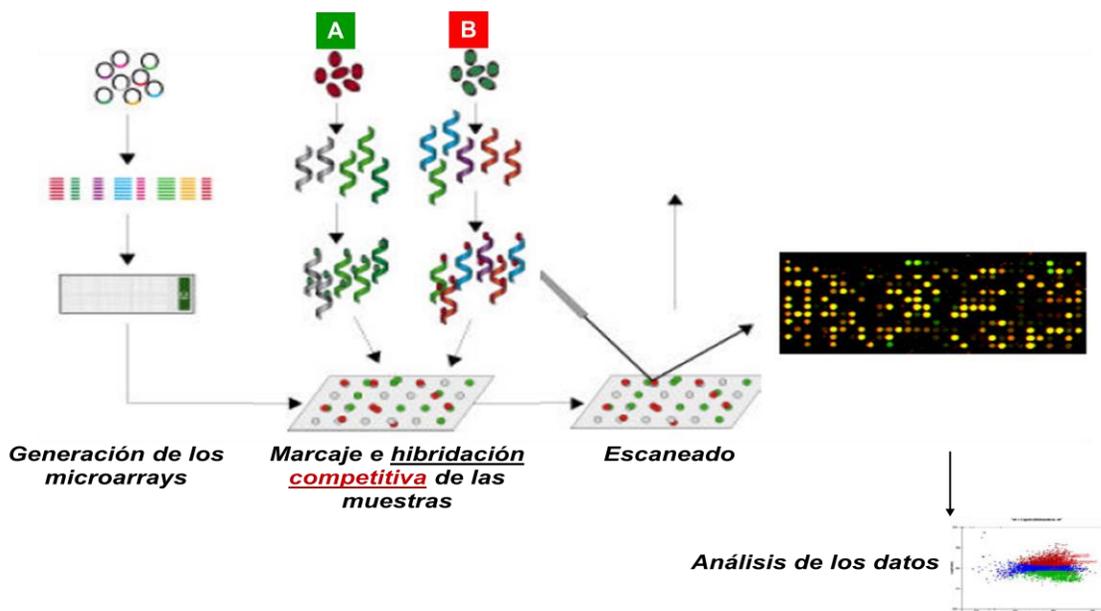
**Determinación de la calidad del RNA, Amplificación y Marcaje de la Muestra.** El RIN se determina en un Bioanalyzer 2100 (Agilent) siguiendo el procedimiento expuesto para este equipo en la ficha técnica correspondiente y utilizando los Chips de ARN6000 Nano (Agilent). Una vez comprobada la calidad del ARN (RIN superior a 7), la amplificación (si es necesaria) y el marcaje se llevan a cabo siguiendo el protocolo que previamente se haya decidido junto con el usuario (también puede recibirse en la Unidad las muestras ya marcadas con lo que se procedería directamente a la hibridación). Si los arrays son comerciales, se utilizan los protocolos que las casas Affymetrix (marcaje con biotina) y Agilent (1 o 2 colores) propongan dependiendo del tipo de array.

**Hibridación.** Se seguirán los protocolos correspondientes de las casas Affymetrix o Agilent y el uso de su equipamiento (hornos de hibridación, cámaras y estación fluidica).

**Escaneado.** Para cualquier microarray que no sea Affymetrix se utilizará el escáner GenePix 4000B de Axon y el programa GenePix Pro v 4.1 para el análisis de la imagen y cuantificación de datos de fluorescencia. Para ello se tendrán en cuenta los controles que el usuario haya introducido en el array (controles positivos, negativos, de relación, de cantidad, "spikes") o bien se verá que la relación de ambos canales en el histograma que realiza el equipo sea o esté cercana a 1 (arrays de 2 colores). Para los arrays de Affymetrix se utilizará el escáner de su plataforma, GeneChip Scanner 3000 7G y su programa para el análisis de la imagen y procesamiento de los datos de fluorescencia.

Los resultados ofrecidos serán de normalización de la imagen y preprocesamiento de los datos normalizados por RMA que ofrece valores numéricos en log2 que permiten la comparación directa de los valores de expresión.

Para el posterior análisis estadístico ponerse en contacto con la Unidad de Bioinformática .



Ejemplo microarray de expresión de 2 colores

## APLICACIONES

---

Los Microarrays de ADN son una de las herramientas actuales de la Genómica Funcional y se pueden utilizar para:

- Expresión Transcripcional: Análisis global de la expresión génica (transcriptoma), identificación de procesamientos alternativos, miRNAs
- Estudios de supresión y amplificación de ADN genómico (CGHs).
- Identificación de regiones de unión ADN-proteína (ChIPs).
- Detección de mutaciones y polimorfismos (SNPs).
- Metilación del ADN (Epigenética).
- Secuenciación del ADN (fragmentos cortos).

## REFERENCIAS

---

<http://www.genomics.agilent.com/en/home.jsp>

[http://www.affymetrix.com/estore/browse/level\\_one\\_category\\_template\\_one.jsp?category=35796&categoryIdClicked=35796&parent=35796](http://www.affymetrix.com/estore/browse/level_one_category_template_one.jsp?category=35796&categoryIdClicked=35796&parent=35796)

## Open Array (QuantStudio 12K Flex Real -Time PCR)

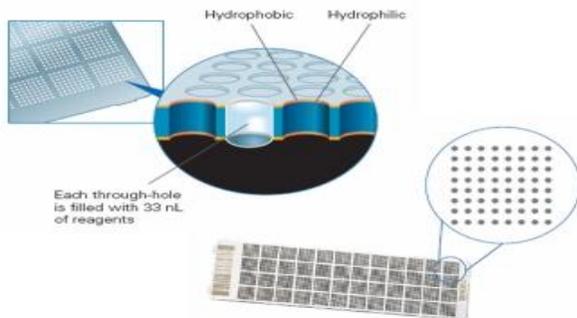
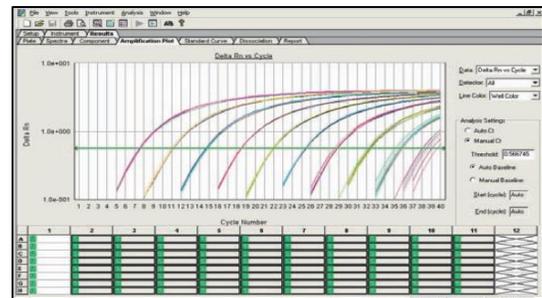
### OBJETIVO

La cuantificación absoluta y relativa de ácidos nucleicos, la discriminación alélica de variantes genéticas que afectan a un único nucleótido (estudios de SNPs), la detección de secuencias de ácidos nucleicos de particular interés (ensayos de tipo plus/minus) y la generación de curvas de disociación, analizando un elevado número de muestras de forma simultánea.

### ESTADO DEL ARTE

La PCR en tiempo real, también denominada PCR cuantitativa se basa en detectar la fluorescencia emitida cuando se genera un producto de ADN durante la amplificación. La señal obtenida al final de cada ciclo de amplificación se representa en una gráfica frente al número de ciclos y se obtiene una curva que muestra el transcurso del proceso. Está demostrado que la concentración de ADN es proporcional al número de ciclos durante la fase exponencial. Así, si conocemos el número de ciclos que lleva a cada muestra a alcanzar un mismo punto de la fase exponencial, podemos precisar el contenido de ADN inicial de forma exacta, ya que la relación es completamente lineal.

La plataforma OpenArray® permite llevar a cabo hasta 3,072 PCRs individuales en una única placa de acero inoxidable. El sistema óptico combina 6 filtros de excitación (450-670 nm) y 6 filtros de emisión (500-720 nm) que permiten trabajar con hasta 21 combinaciones de longitudes de onda en una sola carrera para reacciones en multiplex.



El diseño y la química de los arrays con una superficie hidrofóbica, permite la atracción hidrofílica y de manera pasiva de la solución de carga a los pocillos del array. Dicha carga se realiza mediante un cargador automático. El análisis de la señal de fluorescencia se lleva a cabo con un algoritmo de "multicomponent" que es capaz de sustraer el solapamiento de los espectros de emisión de cada fluorocromo y ofrecer una señal pura de cada una de las emisiones que interviene en cada reacción. Puede realizar una normalización pasiva de la señal usando el fluorocromo ROX.

### DISEÑO EXPERIMENTAL

**Equipamiento.** El equipo es el Quant Studio 12K Flex (Life Technologies) (incluye un robot para la carga de los arrays, AccuFill System)) con los siguientes programas para la recogida y análisis de los datos:

- TaqMan® Genotyper para estudios de genotipado
- Gene Expression Suite para estudios de expresión.
- High Resolution Melting (HRM)
- Software de PCR digital utilizando el bloque y placas de OpenArray®.

**Descripción del procedimiento:** Dependiendo del proyecto, se diseñará un panel específico para el desarrollo de las reacciones dependiendo de cada aplicación. Por otro lado, Life technologies cuenta con ensayos genómicos (SNPs) puestos a punto para humano ratón y rata, y de Gene Expression para todos los genes de humanos, ratón, rata, Arabidopsis thaliana y Drosophila melanogaster.

## **APLICACIONES**

---

- Cuantificación de la expresión génica.
- Discriminación alélica SNPs mediante sondas Taq-Man.
- Ensayos Plus/Minus.
- MicroRNAs
- PCR Digital

## **REFERENCIAS**

---

[https://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb\\_marketing/documents/generaldocuments/cms\\_081550.pdf](https://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_marketing/documents/generaldocuments/cms_081550.pdf)

[https://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb\\_support/documents/generaldocuments/cms\\_102213.pdf](https://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_support/documents/generaldocuments/cms_102213.pdf)

## PCR a tiempo real.

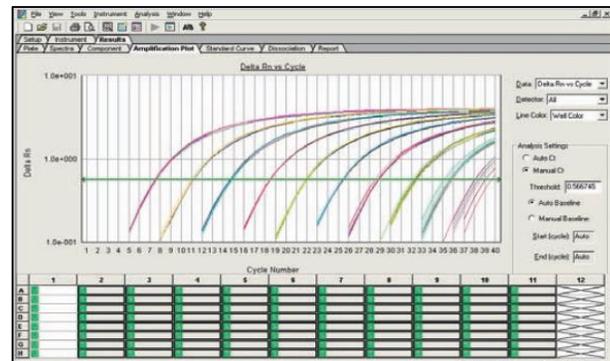
### OBJETIVO

Cuantificar la cantidad de ADN o ARN presentes en una muestra, identificar con una muy alta probabilidad muestras de ADN específicas y la discriminación alélica de variantes genéticas que afectan a un único nucleótido (estudios de SNPs).

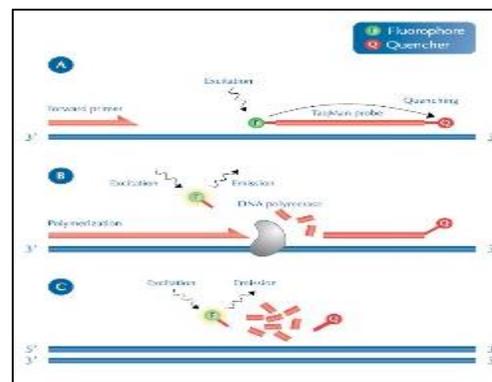
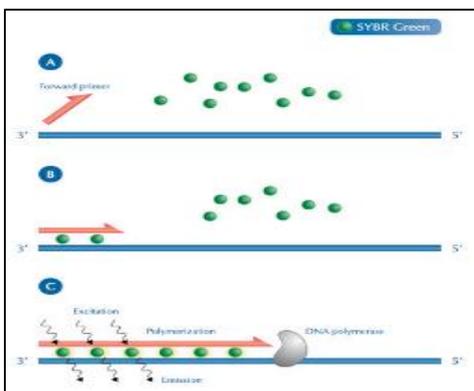
### ESTADO DEL ARTE

La PCR en tiempo real, también denominada PCR cuantitativa se basa en detectar la fluorescencia emitida cuando se genera un producto de ADN durante la amplificación. Se realiza en un equipo que integra una PCR convencional y un espectrofluorímetro que detecta mediante un láser, la fluorescencia que se produce en el tubo de amplificación en todo momento a lo largo del proceso.

La señal obtenida al final de cada ciclo de amplificación se representa en una gráfica frente al número de ciclos y se obtiene una curva que muestra el transcurso del proceso. Está demostrado que la concentración de ADN es proporcional al número de ciclos durante la fase exponencial. Así, si conocemos el número de ciclos que lleva a cada muestra a alcanzar un mismo punto de la fase exponencial, podemos precisar el contenido de ADN inicial de forma exacta, ya que la relación es completamente lineal.



La química que se utiliza en la detección es SYBR Green como agente intercalante (no específico de producto) o la tecnología de las sondas marcadas fluorescentemente, denominadas sondas Taqman (específicas del producto amplificado). Las ventajas del uso de éstas últimas son que el producto amplificado y cuantificado es específico y además se pueden detectar varios productos al mismo tiempo ya que podemos hacer combinaciones de hasta 5 fluoróforos diferentes.



### DISEÑO EXPERIMENTAL

**Equipamiento.** El equipo disponible es un termociclador 7500 Fast (Life Technologies) con el programa SDS 1.3.1 para la recogida y análisis de los datos.

**Descripción del procedimiento:** El equipo se oferta en modo Autoservicio, por lo que el usuario debe traer sus muestras preparadas en tiras de tubos de 8 unidades o en placas de 96 pocillos (compatibles con el equipo 7500 Fast). Se recomienda

adjuntar una tabla indicando el nombre de las muestras y posición, ya que no se deben rotular ni las tiras de tubos ni las placas de 96. En caso de necesitar asesoramiento para el diseño del experimento se debe contactar con la Unidad.

## **APLICACIONES**

---

- Cuantificación génica, absoluta y relativa.
- Cuantificación de la expresión génica.
- Discriminación alélica mediante sondas Taq-Man.
- Detección y cuantificación de microorganismos.
- Detección y cuantificación de OGMs
- Detección de SNPs y mutaciones.
- Ensayos Plus/Minus.

## **REFERENCIAS**

---

<https://www.lifetechnologies.com/es/en/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-assays.html?cid=ism5-taqman-090113>

## Secuenciación de ADN “ Sanger”

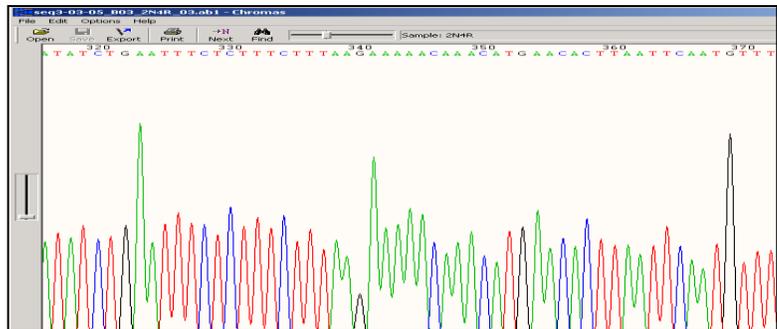
### OBJETIVO

Determinación del orden de los nucleótidos (Adenina, Timina, Guanina y Citosina) que componen una determinada cadena de ADN.

### ESTADO DEL ARTE

La técnica de secuenciación está basada en la metodología de Sanger de 1977. Se emplea una polimerasa que copia la cadena molde a ADN de cadena sencilla partiendo de cebadores universales o específicos en presencia de una mezcla de reacción que contiene los cuatro nucleótidos (dNTPs) y una pequeña cantidad de sus análogos dideoxynucleótidos (ddNTPs) que presentan un grupo –H en el extremo 3’ de la desoxiribosa, lo que implica que la polimerasa puede incorporarlos, pero al no encontrar el grupo –OH del extremo 3’, no pueda seguir colocando nucleótidos en la cadena y por tanto la reacción se termine. Estos ddNTPs se encuentran marcados con fluorocromos diferentes dependiendo de la base nitrogenada de que se trate (por ej. Azul para la C, verde para la A, rojo para la T y amarillo para la G).

En la reacción de secuenciación se producen cadenas de ADN (lecturas sobre un mismo ADN molde) de distintas longitudes, diferentes entre sí en una sola base y terminando todas en el lugar en el que se incorporó un dideoxynucleótido al azar. Estos productos son sometidos a electroforesis en gel o capilar. El resultado es un patrón de bandas o picos de intensidad de fluorescencia (según el tipo de electroforesis empleado) en orden de menor a mayor, que son detectados mediante un láser e identificados por el color del fluorocromo de la última base colocada por la polimerasa, deduciéndose así la secuencia del ADN introducido.



### DISEÑO EXPERIMENTAL

**Equipamiento.** El equipo disponible es un secuenciador multicapilar ABI 3130XL (Life Technologies). La química utilizada es la de terminadores de Life Technologies BigDye Terminator Cycle Sequencing v 3.1 o v 1.1. Las reacciones de secuenciación se llevan a cabo en termocicladores (PCR System 9700 de Applied Biosystems y T3 de Biometra), ajustándose las condiciones a las Tm de los cebadores específicos.

**Descripción del procedimiento:** La calidad de los datos obtenidos depende en gran medida de la pureza y correcta cuantificación de las muestras de ADN proporcionadas. Se recomienda utilizar protocolos de extracción, purificación y cuantificación fiables, que permitan verificar la integridad y concentración de la muestra. Es muy importante que el usuario prepare siempre las muestras diluidas en agua. Evitar el tampón TE y los buffers de elución de ADN de los kits comerciales ya que la presencia de EDTA en la muestra inhibe la reacción de secuenciación.

Las cantidades requeridas de ADN para la reacción son:

	Productos de PCR	Plásmidos	Cósmidos y BACs
Cantidad de ADN	15-20 ng / 100 pb	300-500 ng	1000-1500 ng
Primer o cebador	3.2 pmol	3.2 pmol	10-15 pmol

Se debe completar hasta un volumen total de 6 µl en tubos de PCR de 0,2 ml con agua miliQ. Si el cebador viene incluido se completará hasta 7µl. Si no se pueden cumplir estos requisitos se debe comunicar a los técnicos de la Unidad para llevar a cabo los cambios necesarios en la reacción. Las reacciones se realizan en un volumen final de 10µl.

El Servicio dispone de los siguientes cebadores universales, sin coste adicional para el usuario:

T7	5' -TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG – 3'
T3	5' - ATT AAC CCT CAC TAA AGG GA- 3'
M13 Forward	5' - TGT AAA ACG ACG GCC AGT- 3'
M13 Reverse	5' - CAG GAA ACA GCT ATG ACC- 3'
SP6	5' – GAT TTA GGT GAC ACT ATA G- 3'
T <sub>25</sub> (A,G o C)	5' – TTT TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT T(A, G o C)- 3'

Tras la reacción de secuenciación, éstas se purifican para eliminar terminadores que no hayan participado en la reacción y que puedan interferir en el análisis de los resultados y se cargan en los secuenciadores automáticos. El programa que recoge datos es el 3130XL Data Collection v.3.0 y se analizan con el DNA Sequencing Analysis Software v 5.2. El usuario puede visualizar los ficheros (fluorograma de picos y texto de la secuencia) mediante programas libres en la red (Edit View y Chromas).

## APLICACIONES

---

La técnica de secuenciación se utiliza de forma rutinaria para :

- Detección de mutaciones.
- Diagnóstico de enfermedades genéticas
- Identificación de especies y control entre cruzamientos.
- Secuenciación de ADN's fósiles.
- Diagnóstico prenatal y preimplantacional.
- Proyectos de secuenciación de genomas.

## REFERENCIAS

---

Sanger F, Nicklen S, y Coulson AR. *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1977 Diciembre; 74(12): 5463–5467.

Smith LM, Sanders JZ, Kaiser RJ, Hughes P, Dodd C, Connell CR, Heiner C, Kent SB, Hood LE. *Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis*. Nature. 1986 Jun 12-18; 321 (6071):674-9.

Smith, LM., Luckey JA, Drossman H, Kostichka AJ, Mead DA, D'Cunha J, Norris TB. *High speed DNA sequencing by capillary electrophoresis*. Nucleic Acids Research 1990, **18**: 4417–4421.

Life Technologies: [https://www.lifetechnologies.com/es/en/home/life-science/sequencing/sanger-sequencing/sanger\\_sequencing\\_method.html](https://www.lifetechnologies.com/es/en/home/life-science/sequencing/sanger-sequencing/sanger_sequencing_method.html)

## Secuenciación masiva (“NGS”)

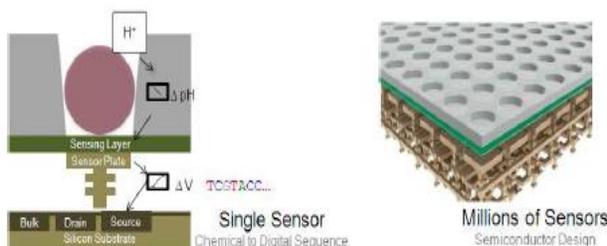
### OBJETIVO

La obtención de millones de secuencias de ADN de forma simultánea, paralela.

### ESTADO DEL ARTE

La secuenciación masiva tiene el potencial de detectar todos los tipos de variación genómica en un único experimento, incluyendo variantes de nucleótido único o mutaciones puntuales, pequeñas inserciones y deleciones, y también variantes estructurales.

Las tecnologías de secuenciación actualmente utilizadas para la NGS difieren en varios aspectos, pero el esquema principal de trabajo es similar para todas ellas. El ADN se fragmenta y mediante ligación se le añaden secuencias adaptadoras a los extremos. Los fragmentos de ADN a continuación se amplifican clonalmente y se agrupan juntos (*clustering*) para ser utilizados como entidades a secuenciar. Las secuencias cortas obtenidas se denominan lecturas o *reads* que son alineados contra una secuencia de referencia. Un aspecto importante en la NGS es el número de veces que cada base del genoma está presente en los *reads* de secuenciación producidos. Este valor se denomina profundidad de cobertura (*coverage*) y es uno de los factores determinantes para evaluar la fiabilidad del nucleótido asignado a esa posición del genoma.



La tecnología de Ion Torrent utiliza chips de sensores de tipo semiconductor que miden la liberación de protones durante la reacción de polimerización del ADN. La detección se realiza en todos los sensores en paralelo y en tiempo real, por lo que la duración de las carreras es de solo unas horas.

La tecnología de Ion Torrent utiliza chips de sensores de tipo semiconductor que miden la liberación de protones durante la reacción de polimerización del ADN. La detección se realiza en todos los sensores en paralelo y en tiempo real, por lo que la duración de las carreras es de solo unas horas.

### DISEÑO EXPERIMENTAL

**Equipamiento.** Los equipos disponibles son el Ion PGM y el Ion S5 (Life Technologies-Thermo Fisher), secuenciadores basados en la tecnología de los semiconductores, un sistema más simple y rápido que elimina la necesidad de sistemas ópticos de detección y reduce las químicas. Contar con ambos equipos nos proporciona escalabilidad y flexibilidad para llevar a cabo las diversas aplicaciones a las que podemos dar respuesta. Los chips disponibles son:

Tipo de Chips		Longitud de Lectura	Nº de Lecturas (millones)	Datos de Salida
PGM	Ion 314	200-400 pb	0,4-0,55	30-100 Mb
	Ion 316		2-3	0,3-1Gb
	Ion 318		4,5-5	0,6-2Gb
S5	Ion 520	200-400 pb	3-5	0,6-2Gb
	Ion 530		15-20	3-8 Gb
	Ion 540	200 pb	60-80	10-15 Gb



Disponemos también de los siguientes equipos para la preparación de muestras, librerías y carga de los chips: One Touch 2.0 y Ion Chef (Life Technologies-Thermo Fisher).

## Descripción del procedimiento.

Los pasos básicos del flujo de trabajo son iguales en ambas plataformas:

- Entrega de la muestra y preparación de la librería (específica de aplicación). También se puede entregar la librería ya preparada siempre que sea compatible con el sistema de secuenciación Ion Torrent. En ambos casos se examinará la calidad y requisitos de las muestras/librerías antes de comenzar (Bioanalyzer, Fluorimetría-Qubit).
- Preparación del molde de secuenciación: Amplificación clonal y enriquecimiento de las muestras.
- Secuenciación en el PGM o en el Ion S5.
- Análisis primario de los datos. Uso de los programas Torrent Suite y Ion Reporter.

Para un estudio completo y detallado de los resultados contactar con la Unidad de Bioinformática.

## **APLICACIONES**

---

La técnica de secuenciación masiva se utiliza para :

- Re-secuenciación dirigida de DNA/RNA
- Análisis estructurales de DNA
- Perfiles de expresión génica de mRNAs y microRNAs.
- Secuenciación de Microorganismos *de novo*
- Tipificación de Bacterias y Virus
- Metagenómica
- ChIP secuenciación (Chromatin Immunoprecipitation)
- Análisis de metilación
- Validación de SNPs
- Transcriptoma completo
- Genotipado por secuenciación
- Secuenciación de exoma

## **REFERENCIAS**

---

<https://www.thermofisher.com/us/en/home/life-science/sequencing/next-generation-sequencing.html>

<https://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/small-genome-ecoli-de-novo-app-note.pdf>

<https://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/ion-S5-S5XL-Brochure.pdf>

<https://www.thermofisher.com/us/en/home/life-science/sequencing/next-generation-sequencing/ion-torrent-next-generation-sequencing-publications-literature.html>

## Muestreo de mutaciones mediante cromatografía líquida desnaturalizante de alto rendimiento ( D-HPLC).

### OBJETIVO

Método de muestreo en fragmentos de ADN amplificados para la detección de mutaciones, mediante la comparación con una muestra control.

### ESTADO DEL ARTE

La técnica D-HPLC es un método de cromatografía líquida en el cual se separan fragmentos de ADN según su tamaño o según la presencia de heterodúplex (cadenas de ADN reasociadas tras desnaturalización) durante su tránsito por el gradiente de una columna.

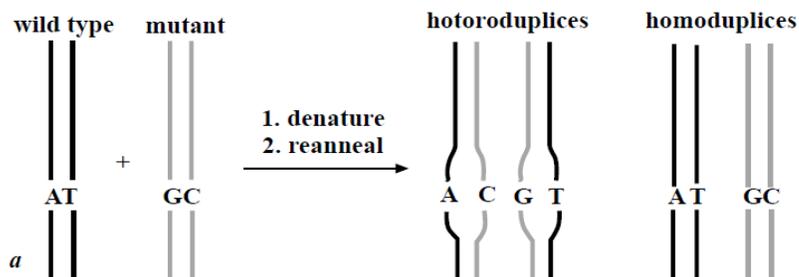
En el ADN amplificado de doble cadena, los nucleótidos que se asocian erróneamente a causa de mutaciones y polimorfismos se hacen evidentes después de la formación de heterodúplex. La presencia de estos polimorfismos crea una mezcla de heterodúplex y homodúplex durante la renaturalización del ADN silvestre y mutante. Si esta mezcla se hace migrar mediante HPLC en condiciones parcialmente desnaturalizantes, los heterodúplex migran de la columna antes que los homodúplex debido a que su temperatura de fusión es más baja. La detección se lleva a cabo mediante absorvancia de UV a 260nm.

### DISEÑO EXPERIMENTAL

**Equipamiento.** El equipo disponible es un D-HPLC Helix™ ( Varian).

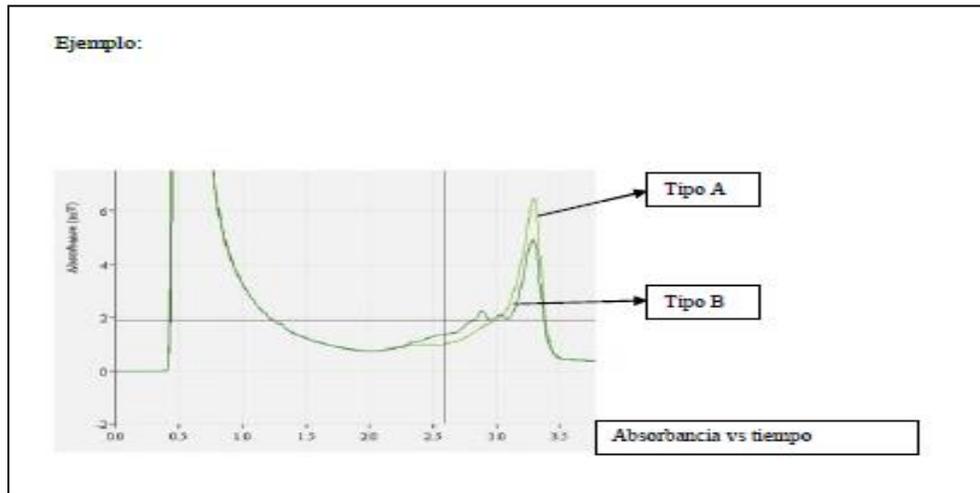
**Descripción del procedimiento:** Una vez las muestras son entregadas en la Unidad, si se trata sólo de análisis de tamaño, se cargan en el D-HPLC para llevar a cabo la separación por cromatografía líquida a 50°C (condiciones no desnaturalizantes). Se carga un control de resolución de tamaños, pUC18 HaeIII.

Cuando lo que se requiere es la detección de diferencias en la secuencia, antes de ser cargadas en el D-HPLC, se realiza una desnaturalización del fragmento amplificado a 95 °C durante tres minutos, seguido de una disminución progresiva de la temperatura de 95 °C a 65 °C durante 30 minutos, permitiendo así que las hebras se renaturalicen lentamente. Con este proceso se podrán detectar las mutaciones (*mismatches*) ya que al renaturalizar lentamente provocamos que se forme de nuevo la doble hebra de ADN, formándose los correspondientes homodúplex y heterodúplex (en el caso de la existencia de mutaciones). Los heterodúplex, que son térmicamente menos estables que su correspondiente homodúplex, se separan por cromatografía líquida de fase reversa de forma diferente a los homodúplex, cualquier cambio en el perfil de elución, incluyendo cambios sutiles, como la apariencia del frente o un ensanchamiento de un pico, es diagnóstico y permite establecer la localización y naturaleza de la base o bases alteradas (muestreo de mutaciones).



**Figura 1.** Después de la desnaturalización y renaturalización del producto de la PCR, no sólo se forman los homodúplex, sino también heterodúplex, procedentes de la combinación de la cadenas sentido y antisentido de cada homodúplex.

La cromatografía ha de llevarse a cabo a la temperatura (condiciones parcialmente desnaturizantes) que previamente se haya decidido óptima para dicho producto de PCR, si se conoce su secuencia se introduce en el programa que ofrece la Universidad de Stanford vía Internet (<http://insertion.stanford.edu/melt.html>); si no, se realizan una serie de inyecciones de la muestra a diferentes temperaturas para determinar aquella que sea óptima (el tiempo de retención disminuye al ir aumentando la temperatura hasta alcanzar la óptima). En este caso el control lo constituye el estándar D-HPLC DYS271.



## APLICACIONES

---

- Detección de mutaciones relacionadas con determinadas enfermedades genéticas.
- Identificación de diferentes cepas en una flora microbiana (ej, flora intestinal).
- Muestreo de SNPs en gran número de muestras.

## REFERENCIAS

---

Denaturing high- performance liquid chromatography: A review. Xiao W, Oefner PJ. Hum Mutat 2001 Jun; 17 (6): 439-74

DNA mutation detection using denaturing high-performance liquid chromatography (DHPLC). Yu B, Sawyer NA, Chiu C, Oefner PJ, Underhill PA. Curr Protoc Hum Genet. 2006 Feb; Chapter 7:Unit7.10.

Allelic discrimination by denaturing high-performance liquid chromatography. Oefner PJ. J Chromatogr B Biomed Sci Appl. 2000 Mar 10; 739(2):345-55.

In-depth mutation and SNP discovery using DHPLC gene scanning. Lilleberg SL. Curr Opin Drug Discov Devel. 2003 Mar; 6(2):237-52.

## Identificación, caracterización y cuantificación de péptidos y proteínas por técnicas de nanoHPLC-espectrometría de masas.

### OBJETIVO

Identificación, cuantificación y caracterización de péptidos y proteínas por nano-cromatografía líquida-espectrometría de masas, procedentes de muestras biológicas.

### ESTADO DEL ARTE

La Proteómica se ocupa directamente de la integración de la expresión a gran escala de los genes con su función celular a nivel de proteína. La espectrometría de masas acoplada a nano-cromatografía líquida se ha convertido el método de análisis de proteínas por excelencia. Proteómica basada en MS es una disciplina que se ha hecho posible gracias a la disponibilidad de bases de datos de genes y la secuencia del genoma y los avances técnicos y conceptuales en muchas áreas, especialmente el descubrimiento y desarrollo de métodos de ionización de péptidos y proteínas junto con las mejoras en métodos de preparación y separación.

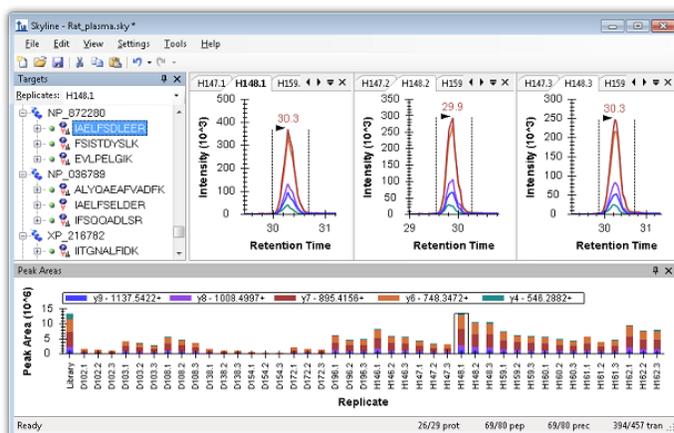
Actualmente, se vienen usando un número considerable de aproximaciones técnicas proteómicas de alto rendimiento tales como el "shotgun", el uso de marcaje isotópico (iTRAQ, TMT, SILAC) y métodos de "label free", los cuales usan datos de espectros adquiridos por CID, fundamentalmente, que derivan en la identificación de una lista de péptidos y sus correspondientes proteínas. Por otra parte los métodos de Proteómica dirigida como Selected/Multiplex Reaction Monitoring (SRM/MRM), Parallel Reaction Monitoring (PRM), métodos de adquisición de dato-independiente (DIA/SWATH) y métodos de Proteómica dirigida en MS1 dato-dependiente se han convertido en herramientas muy potentes para la cuantificación, descubrimiento y validación de biomarcadores, en rangos de límites de detección entre pico y attomolar. Todo ello en sinergia con la bioinformática que permite tanto el manejo de secuencias de genoma y/o transcriptoma como bases de datos para identificación y análisis de proteínas en cualquier tipo de organismo, además de la integración de resultados enmarcada dentro de la biología de sistemas.

### EQUIPAMIENTO

La Unidad de Proteómica dispone de dos sistemas basados tanto en DDA como en DIA por medio de tecnología Orbitrap Fusion (Thermo Scientific) y QTRAP (Sciex) que permite abarcar un rango de análisis muy amplio.

Los flujos de trabajo que se realizan con tecnología Orbitrap permite una colección amplia de espectros CID y/o HCD MS/MS en alta resolución para identificar sus proteínas con la ayuda de algoritmos de búsqueda específicos (MASCOT, SEQUEST,

PARAGON, XTAMDEM, OMMSA, etc). Previamente las mezclas de péptidos se separan por nano-cromatografía en 1 ó 2 dimensiones (nano-UHPLC Ultimate 3000, Dionex-Thermo) por fase reversa o intercambio iónico seguido de fase reversa, respectivamente. Además la tecnología QTRAP facilita la realización de métodos SRM/MRM para el estudio de biomarcadores en experimentos de proteómica dirigida. Todos los datos generados por Proteómica cuantitativa pueden ser analizados por programas específicos como Skyline (McCoss Lab.), SIEVE (Thermo Scientific), Progenesis Q1 (Waters), etc mediante la cuantificación de iones en MS y MS/MS.



## APLICACIONES

---

- Análisis de péptidos y proteínas en agroalimentación e investigación clínica, biomédica y básica.
- Identificación y cuantificación de biomarcadores tanto para la industria farmacéutica como la agroalimentaria.
- Detección de alérgenos proteicos en alimentos.

## REFERENCES

---

1. Mass spectrometry-based proteomics. Ruedi Aebersold & Matthias Mann Nature 422, 198-207 (13 March 2003)
2. Electrospray ionization for the mass spectrometry of large biomolecules Fenn, J. B., Mann, M., Meng, C. K., Wong, S. F. & Whitehouse, C. M.. Science 246, 64-71 (1989).
3. Multiplexed and data-independent tandem mass spectrometry for global proteome profiling. Chapman JD1, Goodlett DR, Masselon CD. Mass Spectrom Rev. 2014 Nov-Dec;33(6):452-70. doi: 10.1002/mas.21400
4. Skyline: An Open Source Document Editor for Creating and Analyzing Targeted Proteomics Experiments. MacLean, Bioinformatics 2010

## Identificación de proteínas por espectrometría de masas MALDI TOF-TOF

### OBJETIVO

Identificación de proteínas, con herramientas bioinformáticas, a partir de datos obtenidos por espectrometría de masas en tandem (MS+MS/MS), usando búsquedas en bases de datos.

### ESTADO DEL ARTE

MALDI-TOF/TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization - Time-Of-Flight) es una técnica de ionización suave utilizada en espectrometría de masas para el análisis de péptidos e incluso proteínas enteras hasta un cierto tamaño. Los péptidos o proteínas son ionizados por la incidencia de un láser de nitrógeno sobre la muestra. La ionización se favorece por la mezcla del material proteico con una matriz sólida, generalmente el ácido alfa-ciano-4-hidroxicinámico. En este tipo de ionización los péptidos toman o pierden un único protón ( $z=+1$ ).

En un primer análisis de masas (MS) se determina el valor  $m/z$  de los péptidos, y algunos de estos son seleccionados de forma individual, aislados y fragmentados. Los fragmentos generados se separan y analizan en un segundo análisis de masas, obteniendo el espectro de fragmentación o MS/MS de cada péptido, que contiene información tanto de la masa del péptido precursor como de la secuencia de aminoácidos de este.

Los espectrómetros de masas de tipo MALDI TOF/TOF son muy utilizados para identificar proteínas por varias razones: son altamente sensibles, cuentan con un elevado poder de resolución y son capaces de medir con excelente exactitud la masa.

La aplicación de la técnica MALDI TOF/TOF a la Proteómica, junto con la disponibilidad de bases de datos y el desarrollo de herramientas informáticas ha supuesto un gran avance en la identificación de proteínas.

### METODOLOGIA

**Equipamiento.** El equipo disponible es un Espectrómetro de Masas 4800 Plus MALDI TOF/TOF Analyzer (AB Sciex). Como equipamiento accesorio, se dispone de una Estación Automática de Picado de Geles (ProPic, Genomic Solutions) y una Estación Automática de Digestión y Dispensación de Proteínas sobre Placa de MALDI (PROPREP II, Digilab).

**Descripción del procedimiento:** Los péptidos resultantes de la digestión con tripsina de las proteínas de interés (proteínas separadas en gel o proteínas en solución), se purifican mediante una microcolumna de resina C18 (ZipTip, Millipore), eluyéndose directamente con una solución de matriz (3 mg/ml de ácido alfa-ciano-4-hidroxicinámico en 70% acetonitrilo/0.1% TFA) sobre la placa MALDI en un volumen de 1  $\mu$ l. Tras la cocrystalización sobre la placa, las muestras se analizan mediante espectrometría de masas MALDI-TOF/TOF para obtener la huella peptídica (MS) en un espectrómetro de masas (4800 Plus MALDI TOF/TOF Analyzer (AB Sciex)) equipado con extracción retardada, reflector y en modo positivo, en un rango de masa/carga ( $m/z$ ) de 800 a 4000 Da, con un voltaje de aceleración de 20 kV. Se realiza calibración interna de los espectros utilizando las relaciones masa/carga ( $m/z$ ) de los péptidos resultantes de la autólisis de la tripsina porcina ( $M+H^+=842.509$ ,  $M+H^+=2211.104$ ), obteniéndose de esta manera una precisión en la medida de las  $m/z$  de  $\pm 20$  ppm. De cada muestra se obtienen espectros de fragmentación (MS/MS) de las ocho  $m/z$  más intensas.

La identificación de proteínas se realiza combinando los espectros MS y sus correspondientes MS/MS sobre bases de datos públicas de secuencias de proteínas (NCBI nr ó Uniprot), utilizando MASCOT v2.0 (Matrix Science Ltd., London; <http://www.matrixscience.com>) como motor de búsqueda, integrado en el programa GPS Explorer™ v3.5 (AB Sciex).

## APLICACIONES

---

- Identificación de proteínas implicadas en procesos biológicos.
- Estudios de cambios de expresión proteica.
- Análisis del proteoma como herramienta para la caracterización de diferentes enfermedades y/o caracterización funcional de distintos organismos.
- Detección de biomarcadores de enfermedades para su posterior uso en clínica; estudios de respuesta a tratamientos; respuesta ante el envejecimiento.

## REFERENCIAS

---

1. Henzel, W.J., Watanabe, C. and Stults, J.T. (2003). Protein identification: the origins of peptide mass fingerprinting. *Journal of The American Society for Mass Spectrometry*, 14(9), 931-942.
2. Santos-González, M., López-Miranda, J., Pérez-Jiménez, F., Navas, P. and Villalba, J.M. (2011) Dietary oil modifies the plasma proteome during aging in the rat. *AGE*. DOI 10.1007/s11357-011-9239-z.
3. Castillejo, M.A., Fernández-Aparicio, M. and Rubiales, D. (2012). Proteomic analysis by two-dimensional in gel electrophoresis (2D DIGE) of the early response of *Pisum sativum* to *Orobanche crenata*. *Journal of Experimental Botany*, 63(1), 107-119. doi:10.1093/jxb/err246.
4. Collado-Romero, M., Martins, R.P., Arce, C., Moreno, A., Lucena, C., Carvajal, A. and Garrido, J.J. (2012). An in vivo proteomic study of the interaction between *Salmonella typhimurium* and porcine ileum mucosa. *Journal of Proteomics*, 75, 2015-2026. doi:10.1016/j.jprot.2012.01.001.
5. Fuentes-Almagro, C.A., Prieto-Álamo, M.J., Pueyo, C. and Jurado, J. (2012). Identification of proteins containing redox-sensitive thiols after PRDX1, PRDX3 and GCLC silencing and/or glucose oxidase treatment in Hepa 1-6 cells. *Journal of Proteomics*, 77, 262-279. doi:10.1016/j.jprot.2012.08.025.
6. Peinado, J.R., Pardo, M., de la Rosa, O. and Malagón, M.M. (2012). Proteomic characterization of adipose tissue constituents, a necessary step for understanding adipose tissue complexity. *Proteomics*, 12, 607-620. doi:10.1002/pmic.201100355.
7. Aragüez, I., Cruz-Rus, E., Botella, M.A., Medina-Escobar, N., and Valpuesta, V. (2013). Proteomic analysis of strawberry achenes reveals active synthesis and recycling of L-ascorbic acid. *Journal of Proteomics*, 83, 160-179. doi:10.1016/j.jprot.2013.03.016.

## Determinación de compuestos orgánicos mediante HPLC-MS y compuestos orgánicos volátiles y semivolátiles mediante GC-MS

### OBJETIVO

Determinación cualitativa y/o cuantitativa de compuestos orgánicos de diversas matrices (sólidas, líquidas) previamente tratadas para poder ser analizada su composición mediante la técnica tanto de Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución como de Cromatografía de Gases con detección por Espectrometría de Masas.

### ESTADO DEL ARTE

Tanto la técnica de HPLC/Espectrometría de Masas como de GC/Espectrometría de Masas combina la capacidad de separación que presenta la Cromatografía de Líquidos y de Gases con la sensibilidad y capacidad selectiva del detector de Masas. Esta combinación permite analizar y cuantificar compuestos independientemente de la concentración en que se encuentren en mezclas complejas con un alto grado de efectividad.

En el caso de los equipos de baja resolución con ionización fuerte (GC-Triple Cuadrupolo), las moléculas una vez separadas en la columna cromatográfica en función de su afinidad por la fase estacionaria sufren un bombardeo de electrones de una cierta energía, capaces de provocar la emisión estimulada de un electrón de la molécula analizada, y así ionizarla. Además de las moléculas ionizadas también se forman iones fragmento debido a la descomposición de iones moleculares con exceso de energía. El tipo y proporción relativa de cada uno de estos fragmentos es característico de la molécula analizada y de las condiciones del proceso de ionización, y se denomina "fragmento de ionización". La detección consecutiva de los iones formados a partir de las moléculas de la muestra, produce el espectro de masas de esta sustancia, que es diferente para cada compuesto químico, y que constituye una identificación prácticamente inequívoca del compuesto analizado. En algunos casos, este espectro puede ser comparado con los de librerías (NIST, WILEY...), para identificarlos; en otros casos, hay que proceder a una interpretación de los mismos para poder determinar la molécula.

En el caso del equipo de alta resolución con ionización blanda (uHPLC-QToF), las moléculas una vez separadas en la columna cromatográfica en función de su afinidad por la fase estacionaria de la misma, eluyen de la columna y se ionizan, en el caso del acoplamiento con uHPLC, mediante la técnica de ionización Electrospray (modo positivo y/o negativo), formándose fundamentalmente los iones positivos  $[M+H]^+$  (aunque también suelen aparecer aductos  $[M+Na]^+$  y  $[M+NH_4]^+$ ) o negativos  $[M+H]^-$ . El parámetro que se detecta es la relación masa/carga ( $m/z$ ) para cada ión formado en la fuente de ionización. Existen dos modos de trabajo: modo full-scan o MS mediante el cual se realizan barridos en un rango preestablecido de  $m/z$ , y el modo MS/MS mediante el cual se pueden aislar iones en la celda de colisión para promover su fragmentación con un gas adecuado (generalmente  $N_2$ , Ar, He) con el fin de obtener información de los analitos de interés en forma de espectros que ayude a la caracterización estructural de los mismos y, por tanto, a su identificación. El tipo y proporción relativa de cada uno de estos fragmentos es característico de la molécula analizada y de las condiciones del proceso de fragmentación, y se denominan "iones producto". La resolución del espectrómetro de masas es un parámetro clave para evaluar la capacidad de discriminación entre iones de masa parecida y representa un factor a tener en cuenta en función del objetivo del análisis. Un espectrómetro de masas de baja resolución permitirá discriminar entre iones con una diferencia de masa superior a 0.1-1 Da mientras que un equipo de alta resolución permitirá discriminar iones con un error expresado en exactitud de medida de masa de 2 a 5 ppm, de acuerdo con la siguiente expresión matemática:

$$\text{Exactitud de masa (ppm)} = [(m/z \text{ experimental} - m/z \text{ teórica}) / m/z \text{ teórica}] \cdot 10^6$$

siendo *m/z experimental*, el valor de *m/z* que detecta el espectrómetro de masas para un determinado ión, y *m/z teórica*, el valor de *m/z* que correspondería a la fórmula del ión detectado ( $[M+H]^+$ ,  $[M+H]^-$ , generalmente).

## DISEÑO EXPERIMENTAL

---

### Equipamiento.

- Cromatógrafo de Gases-Masas Triple Cuadrupolo (Bruker Mod. Scion): Cromatógrafo de Gases equipado con Inyector PTV para columnas capilares, acoplado a espectrómetro de masas con detector Triple Cuadrupolo e Ionización por impacto electrónico (EI). Posibilidad de trabajar en modos full-scan, SIM y MRM. El Triple Cuadrupolo es un espectrómetro de masas de baja resolución y su principal campo de aplicación es el análisis cuantitativo y cualitativo.
- Cromatógrafo de Líquidos (uHPLC) con fuente ESI acoplado a analizador Cuadrupolo/Tiempo de Vuelo (QTof) (Waters, Xevo G2-XS): HPLC con bomba cuaternaria y muestreador automático acoplado a un espectrómetro de masas de tipo Cuadrupolo-Tiempo de Vuelo (QTOF); ionización por Electrospray en modo positivo y negativo para el acoplamiento con uHPLC. Resolución 40.000 uma. El QTOF es un espectrómetro de masas de alta resolución y su principal campo de aplicación es el análisis cualitativo y de screening.

### Descripción del procedimiento:

Las muestras se enviarán junto con una descripción de las mismas indicando el tipo de análisis a realizar y su posible toxicidad. A ser posible se deben indicar componentes a determinar, niveles de concentración (% , partes por millón...). Las muestras que lo necesiten se enviarán refrigeradas o congeladas. Para las muestras líquidas también se indicarán disolventes, tampones, sales, posibles contaminantes, etc.).

Para aquellas que necesiten que se lleve a cabo un tratamiento de muestra previo a su análisis por GC ó HPLC (extracción, preconcentración, purificación, derivatización), debe adjuntarse algún tipo de información que ayude al laboratorio a optimizar este proceso previo.

Posteriormente se realiza el análisis por GC-MS ó HPLC-MS seleccionando el método optimizado (tipo de inyección, programa horno columna ó modo trabajo isocrático/gradiente, tipo de columna, temperatura de columna, flujo de gas portador ó de fase móvil, modo de ionización (  $ESI^+$  ,  $ESI^-$ ), modo de adquisición de iones (fullscan, SIM, MRM, HRMS). Finalmente los resultados serán cualitativos y/o cuantitativos en función de los intereses del usuario.

Debdo a la complejidad de los equipos y de los softwares que incorporan, los equipos no funcionan en modo autoservicio; siempre será puesto en marcha por el personal técnico de la Unidad del SCAI.

## APLICACIONES

---

Las técnicas de GC-MS y uHPLC-MS en la Metabolómica se utiliza de forma rutinaria para determinar:

- Investigación básica y clínica: identificación y validación de los biomarcadores de metabolitos correlacionados con los estados de las enfermedades.
- Agricultura: identificación de las rutas metabólicas para optimizar el desarrollo de los cultivos, la mejora del rendimiento y la resistencia a pesticidas/herbicidas.
- Alimentos/nutrición: identificación de la presencia o ausencia de metabolitos correlacionados con características importantes, como la calidad de los alimentos, la autenticidad, el sabor y el valor nutricional.
- Farmacéutica: identificación de metabolitos y marcadores de toxicidad para el descubrimiento y desarrollo de fármacos.
- Medioambiental: identificación de metabolitos relacionados con los efectos de las sustancias químicas y otros estresores del entorno de un sistema biológico.

- Biocarburantes: identificación de perfiles de metabolitos para optimizar los procesos de fermentación y la producción de biocarburantes.

## REFERENCIAS

---

1. Mass Spectrometry. Principles and Applications. E. De Hoffmann, J. Charette, V. Stroobant. Wiley.
2. Chemical Ionization Mass Spectrometry. Alex. G. Harrison. CRC Press.
3. Electrospray ionization mass spectrometry. Fundamentals instrumentation & Applications. Richard D. Cole. Wiley- Interscience.
4. Applications of LC-MS in environmental chemistry. D. Barceló. Journal of chromatography library- Volume 59. Elsevier.
5. Gas Chromatography and Mass Spectrometry. A practical guide. Fulton G. Kitson, Barbara S. Larsen. Charles N. McEwen. Academic Press.
6. Quantitative gas chromatography for laboratory analyses and on-line process control. Georges Guiochon and Claude L. Guillemin. Journal of Chromatography library- Volume 42. Elsevier.

## aDNAseq: high-throughput ancient DNA sequencing

### OBJETIVE

---

Genomics analysis to address the genetic origins and relationships of the various human cultures, or other species, to each other.

### BASIC PRINCIPLES

---

The use of high-throughput sequencing techniques in the field of ancient DNA research has been essential for reconstructing the genomes of ancient or extinct organisms, as well as offering insight into past climates, ancient population demographics, and historic pathogens.

As aDNA sequences are generally short in length, damaged, and at low copy number relative to coextracted environmental DNA, high-throughput approaches offer a tremendous advantage over traditional sequencing approaches in that they enable a complete characterization of an aDNA extract. However, the particular qualities of aDNA also present specific limitations that require careful consideration in data analysis.

### INSTRUMENTATION

---

#### Resources.

The Bioinformatics Unit count on skilled researchers and the computational resources needed to carry out the data analysis.

#### Procedure:

Results of high-throughput analyses of aDNA libraries may include chimeric sequences, sequencing error and artifacts, damage, and alignment ambiguities due to the short read lengths. Thus, typical primary data analysis workflows for high-throughput aDNA sequencing experiments may include:

- Separation of individual samples in multiplex experiments, and removal of protocol-specific library artifacts.
- Trimming adapter sequences and merging paired-end sequencing data.
- Base quality score filtering or quality score propagation during data analysis.
- Identification of endogenous molecules from an environmental background and quantification of contamination from other DNA sources.
- Removal of clonal amplification products or the compilation of a consensus from clonal amplification products, and their exploitation for estimation of library complexity.
- Mapping or de-novo assembly.
- Variant call analysis and statistics.

### APPLICATIONS

---

Paleogenomics and intraspecific phylogenetic analysis: ancient DNA research is now not only adding a temporal aspect to evolutionary studies and allowing for the observation of evolution in real time, it also provides important data to help understand the origins of our own species.

### REFERENCES

---

1. Ermanno Rizzi, Martina Lari, Elena Gigli, Gianluca De Bellis and David Caramelli (2012). Ancient DNA studies: new perspectives on old samples. *Genetics Selection Evolution*, 44:21. DOI: 10.1186/1297-9686-44-21
2. Michael Hofreiter, David Serre, Hendrik N. Poinar, Melanie Kuch and Svante Pääbo (2001). Ancient DNA Review. *Nature Reviews Genetics*, 2, 353-359. doi:10.1038/35072071

## DNA microarrays: quantification of gene expression

### OBJETIVE

---

Identification and quantification of gene expression levels of large numbers of genes simultaneously.

### BASIC PRINCIPLES

---

The core principle behind microarrays is hybridization between two DNA strands, the property of complementary nucleic acid sequences to specifically pair with each other by forming hydrogen bonds between complementary nucleotide base pairs. A high number of complementary base pairs in a nucleotide sequence means tighter non-covalent bonding between the two strands. Fluorescently labeled target sequences that bind to a probe sequence generate. Total strength of the signal, from a spot (feature), depends upon the amount of target sample binding to the probes present on that spot. Microarrays use relative quantitation in which the intensity of a feature is compared to the intensity of the same feature under a different condition, and the identity of the feature is known by its position.

In an mRNA or gene expression profiling experiment the expression levels of thousands of genes are simultaneously monitored to study the effects of certain treatments, diseases, and developmental stages on gene expression.

### INSTRUMENTATION

---

#### Resources.

The Bioinformatics Unit count on skilled researchers and the computational resources needed to carry out the data analysis.

#### Procedure:

Microarray data sets are commonly very large, and analytical precision is influenced by a number of variables. Statistical challenges include taking into account effects of background noise and appropriate normalization of the data. Normalization methods may be suited to specific platforms and, in the case of commercial platforms, the analysis may be proprietary.

Algorithms that affect statistical analysis include:

- Image analysis: gridding, spot recognition of the scanned image (segmentation algorithm), removal or marking of poor-quality and low-intensity features (called flagging).
- Data processing: background subtraction (based on global or local background), determination of spot intensities and intensity ratios, visualisation of data (e.g. see MA plot), and log-transformation of ratios, global or local normalization of intensity ratios.
- Class discovery analysis: unsupervised classification to identify whether microarrays (samples) or genes cluster together in groups, which can enable the discovery of new groups that otherwise were not previously known to exist.
- Hypothesis-driven statistical analysis: Identification of statistically significant changes in gene expression, commonly identified using the t-test, ANOVA, Bayesian method Mann–Whitney test methods tailored to microarray data sets, which take into account multiple comparisons or cluster analysis.
- Reduction of the number of dimensions (genes): This may involve linear approaches such as principal components analysis (PCA), or non-linear manifold learning (distance metric learning) using kernel PCA, diffusion maps, Laplacian eigenmaps, local linear embedding, locally preserving projections, and Sammon's mapping.

### APPLICATIONS

---

Expression microarrays is a tool for quantitative assessment of mRNA. Some typical applications are:

- Quantifying the abundance level or relative changes of each transcript during defined developmental stages or under specific treatment conditions.
- Identify naturally existing groups of samples or genes which cluster together, enabling the discovery of new groups that otherwise were not previously known to exist.

## REFERENCES

---

1. Schena M, Shalon D, Davis RW, Brown PO. (1995). Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science*. 270(5235):467-70.
2. David J. Lockhart & Elizabeth A. Winzeler (2000). Genomics, gene expression and DNA arrays. *Nature* 405, 827-836. doi:10.1038/35015701

## RNAseq: whole transcriptome shotgun sequencing

### OBJETIVE

---

Identification and quantification of gene expression at the RNA level. Detection of alternative gene spliced transcripts, gene fusion and mutations/SNPs. Sample/experiment associated transcriptome assembly.

### BASIC PRINCIPLES

---

RNAseq uses next-generation sequencing (NGS) to reveal the presence and quantity of RNA in a biological sample. RNA-Seq facilitates the ability to look at alternative gene spliced transcripts, post-transcriptional modifications, gene fusion, mutations/SNPs and changes in gene expression. In addition to mRNA transcripts, RNA-Seq can look at different populations of RNA to include total RNA, small RNA, such as miRNA, tRNA, and ribosomal profiling. RNA-Seq can also be used to determine exon/intron boundaries and verify or amend previously annotated 5' and 3' gene boundaries.

In contrast to hybridization-based microarrays, RNAseq transcriptome analysis proceed without the limitation of prior knowledge, and solve some technical issues inherent to microarrays, such as cross-hybridization artifacts and poor quantification of lowly and highly expressed genes. However, the enormous data generated pose a fundamental problem of management and analysis.

### INSTRUMENTATION

---

#### Resources.

The Bioinformatics Unit count on skilled researchers and the computational resources needed to carry out the data analysis.

#### Procedure:

The nature of questions researchers may address using RNA-seq data is effectively limitless, so there are even more facets to the analysis of transcriptomes than there are to generating the data itself. Generalizing, a RNAseq study usually requires initial filtering of sequencing reads, assembling those reads into transcripts or aligning them to reference sequences, annotating the putative transcripts, quantifying the number of reads per transcript, and statistical comparison of transcript abundance across samples or treatments.

### APPLICATIONS

---

RNAseq is a tool for quantitative assessment of RNA, but can also be used in an exploratory approach. Some typical applications are:

- Quantifying the abundance level or relative changes of each transcript during defined developmental stages or under specific treatment conditions.
- Analysis of the transcriptome in a rather unbiased way, with single base pair resolution, a tremendous dynamic detection range (>8,000 fold), and low background signals.
- Catalog the diversity of novel transcript species including long non-coding RNA, miRNA, siRNA, and other small RNA classes (eg, snRNA and piRNA) involved in regulation of RNA stability, protein translation, or the modulation of chromatin states.
- Identify allele-specific expression, disease-associated single nucleotide polymorphisms (SNP), and gene fusions.

### REFERENCES

---

1. Wang, Z., Gerstein, M., & Snyder, M. (2009). RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nature Reviews. Genetics*, 10(1), 57–63. <http://doi.org/10.1038/nrg2484>.
2. Han, Y., Gao, S., Muegge, K., Zhang, W., & Zhou, B. (2015). Advanced Applications of RNA Sequencing and Challenges. *Bioinformatics and Biology Insights*, 9(Suppl 1), 29–46. <http://doi.org/10.4137/BBI.S28991>.

# Área de DETERMINACIÓN ESTRUCTURAL Y ANÁLISIS

## ESPECTROMETRÍA DE MASAS Y CROMATOGRAFÍA

- Determinación de compuestos orgánicos volátiles y semivolátiles mediante GC-MS
- Determinación de compuestos orgánicos mediante HPLC-MS
- Determinación de metales mediante la técnica de Plasma de Acoplamiento Inductivo acoplado a Espectrometría de Masas (ICP-MS)

## RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

- Resonancia magnética nuclear en estado sólido (RMN)

## ESPECTROSCOPIA FOTOELECTRÓNICA DE RAYOS X

- Espectroscopia electrónica de rayos X (XPS) y Auger (AES)

## ESPECTROSCOPIA NIR/MIR

- CHNS elemental analysis in agricultural and chemical samples by using a combustion method.

## Determinación de compuestos orgánicos volátiles y semivolátiles mediante GC-MS

### OBJETIVO

Determinación cualitativa y/o cuantitativa de compuestos orgánicos volátiles y semivolátiles de diversas matrices (sólidas y líquidas) previamente tratadas, para llevar a cabo su análisis mediante la técnica de Cromatografía de Gases-Espectrometría de Masas.

### ESTADO DEL ARTE

La Cromatografía de Gases-Espectrometría de Masas es una técnica que combina la capacidad de separación que presenta la Cromatografía de Gases con la sensibilidad y selectividad del detector de Masas. Esta combinación permite analizar cualitativa y cuantitativamente compuestos traza en mezclas complejas con un alto grado de precisión.

Las moléculas una vez separadas en la columna cromatográfica en función de su afinidad por la fase estacionaria sufren un bombardeo de electrones de una cierta energía, capaces de provocar la emisión estimulada de un electrón de la molécula analizada, y así ionizarla. Además de las moléculas ionizadas también se forman iones fragmento debido a la descomposición de iones moleculares con exceso de energía. El tipo y proporción relativa de cada uno de estos fragmentos es característico de la molécula analizada y de las condiciones del proceso de ionización, y se denomina "fragmento de ionización". La detección consecutiva de los iones formados a partir de las moléculas de la muestra, produce el espectro de masas de esta sustancia, que es diferente para cada compuesto químico, y que constituye una identificación prácticamente inequívoca del compuesto analizado. En algunos casos, este espectro puede ser comparado con los de librerías (NIST, WILEY...), para identificarlos; en otros casos, hay que proceder a una interpretación de los mismos para poder determinar la molécula.

### DISEÑO EXPERIMENTAL

#### Equipamiento.

- Cromatógrafo de Gases-Masas Triple Cuadrupolo (Bruker Mod. Scion): Cromatógrafo de Gases equipado con Inyector PTV para columnas capilares, acoplado a espectrómetro de masas con detector Triple Cuadrupolo e Ionización por impacto electrónico (EI). Posibilidad de trabajar en modos full-scan, SIM y MRM.
- Cromatógrafo de Gases con detector de ionización por llama (FID) (Perkin Elmer).
- Cromatógrafo de Gases-Masas con detector cuadrupolar (PerkinElmer Mod. Clarus 600T): Cromatógrafo de Gases equipado con Inyector PTV para columnas capilares, acoplado a espectrómetro de masas con Simple Cuadrupolo. Ionización por EI. Posibilidad de trabajar en modo full-scan, SIM y SIFI.

#### Descripción del procedimiento:

Las muestras se enviarán junto con una descripción de las mismas indicando el tipo de análisis a realizar y su posible toxicidad. A ser posible se deben indicar componentes a determinar, niveles de concentración (% , partes por millón...). Las muestras que lo necesiten se enviarán refrigeradas o congeladas. Para las muestras líquidas también se indicarán disolventes, tampones, sales, posibles contaminantes, etc.

Aquellas muestras que necesiten que se lleve a cabo un tratamiento de muestra previo a su análisis por GC (extracción, preconcentración, purificación, derivatización), debe adjuntarse algún tipo de información que ayude al laboratorio a optimizar este proceso previo.

Posteriormente se realiza el análisis por GC-MS seleccionando el método optimizado (tipo de inyección, programa de inyección, horno, flujo de gas portador, fuente de ionización, modo de adquisición (full-scan, SIM, MRM, SIFI). Finalmente los resultados serán cualitativos y/o cuantitativos en función de los intereses del usuario.

En el caso de solicitar análisis cuantitativos, el usuario debe suministrar los correspondientes patrones y/o materiales de referencia con los que poder realizar las rectas de calibrado necesarias para la cuantificación de los analitos de interés. Asimismo, el laboratorio dispone de dos columnas genéricas de Cromatografía de Gases de diferente polaridad; en caso de necesitar alguna columna específica para poder llevar a cabo los análisis, ésta debe ser subvencionada, en parte, por el usuario.

Debido a la complejidad de estas técnicas, los equipos no funcionan en modo autoservicio y siempre será puesto en marcha por el personal técnico de la Unidad del SCAI.

## APLICACIONES

---

La técnica de GC-MS se utiliza de forma rutinaria para determinar:

- Análisis de contaminantes orgánicos (pesticidas, PAHs, PCBs, organoclorados, hidrocarburos) en matrices diversas como aguas, suelos y alimentos.
- Análisis de compuestos volátiles en matrices orgánicas y acuosas (trihalometanos, hidrocarburos, disolventes...).
- Análisis de compuestos naturales de naturaleza volátil (ej. terpenos).
- Caracterización de mezclas de componentes volátiles, procedentes de procesos de reacción, síntesis química...
- Caracterización de mezclas gaseosas adecuadamente contenidas en recipientes herméticos, o previamente adsorbidas en cartuchos, procedentes de efluentes gaseosos de procesos químicos y/o biológicos.
- Análisis de grasas (perfil de ácidos grasos).
- Determinación de componentes volátiles/semivolátiles en general de baja polaridad y bajo peso molecular (alcoholes, esterres, aldehidos, ácidos orgánicos, compuestos aromáticos...).

## REFERENCIAS

---

1. Gas Chromatography and Mass Spectrometry. A practical guide. Fulton G. Kitson, Barbara S. Larsen. Charles N. McEwen. Academic Press.
2. Quantitative gas chromatography for laboratory analyses and on-line process control. Georges Guiochon and Claude L. Guillemin. Journal of Chromatography library- Volume 42. Elsevier.
3. Mass Spectrometry. Principles and Applications. E. De Hoffmann, J. Charette, V. Stroobant. Wiley.
4. Chemical Ionization Mass Spectrometry. Alex. G. Harrison. CRC Press.

## Determinación de compuestos orgánicos mediante HPLC-MS

### OBJETIVO

Determinación cualitativa y/o cuantitativa de compuestos orgánicos de diversas matrices (sólidas, líquidas) previamente tratadas para poder ser analizada su composición mediante la técnica de Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución con detección por Espectrometría de Masas.

### ESTADO DEL ARTE

La técnica de HPLC/Espectrometría de Masas combina la capacidad de separación que presenta la Cromatografía de Líquidos con la sensibilidad y capacidad selectiva del detector de Masas. Esta combinación permite analizar y cuantificar compuestos independientemente de la concentración en que se encuentren en mezclas complejas con un alto grado de efectividad.

Las moléculas una vez separadas en la columna cromatográfica en función de su afinidad por la fase estacionaria de la misma, eluyen de la columna y se ionizan mediante la técnica de ionización Electrospray (modo positivo y/o negativo), formándose fundamentalmente los iones positivos M+H (aunque también suelen aparecer aductos M+Na y M+NH<sub>4</sub>) o negativos M-H. El parámetro que se detecta es la relación masa/carga (m/z) para cada ión formado en la fuente de ionización. Existen dos modos de trabajo: modo full-scan o MS mediante el cual se realizan barridos en un rango preestablecido de m/z, y el modo MS/MS mediante el cual se pueden aislar iones en la celda de colisión para promover su fragmentación con un gas adecuado (generalmente N<sub>2</sub>, Ar, He) con el fin de obtener información de los analitos de interés en forma de espectros que ayude a la caracterización estructural de los mismos y, por tanto, a su identificación. El tipo y proporción relativa de cada uno de estos fragmentos es característico de la molécula analizada y de las condiciones del proceso de fragmentación, y se denominan "iones producto". La resolución del espectrómetro de masas es un parámetro clave para evaluar la capacidad de discriminación entre iones de masa parecida y representa un factor a tener en cuenta en función del objetivo del análisis. Un espectrómetro de masas de baja resolución permitirá discriminar entre iones con una diferencia de masa superior a 0.1-1 Da mientras que un equipo de alta resolución permitirá discriminar iones con un error expresado en exactitud de medida de masa de 2 a 5 ppm, de acuerdo con la siguiente expresión matemática:

$$\text{Exactitud de masa (ppm)} = [(m/z \text{ experimental} - m/z \text{ teórica}) / m/z \text{ teórica}] \cdot 10^6$$

siendo *m/z experimental*, el valor de m/z que detecta el espectrómetro de masas para un determinado ión, y *m/z teórica*, el valor de m/z que correspondería a la fórmula del ión detectado (M+H<sup>+</sup> y M-H<sup>-</sup>, generalmente).

En general, los compuestos orgánicos que se pueden determinar por esta técnica utilizando la fuente de ionización por Electrospray, deben tener en su estructura grupos funcionales polares para que se puedan ionizar en la misma; así compuestos de naturaleza apolar tales como hidrocarburos o compuestos aromáticos policíclicos no podrían ser determinados con elevada sensibilidad con este tipo de técnica instrumental.

### DISEÑO EXPERIMENTAL

#### Equipamiento.

- Cromatógrafo de Líquidos-Espectrómetro de Masas QTrap (ABSciex, Mod. 5500). HPLC con bomba binaria y muestreador automático acoplado a un espectrómetro de masas de tipo Triple Cuadropolo-Trampa de iones (QTrap); ionización por Electrospray en modo positivo y negativo. Posibilidad de trabajar en modo fullscan, SIM y Masas/Masas

(MRM, experimentos iones padre, iones hijo y linked scan). El QTrap es un espectrómetro de masas de baja resolución y su principal campo de aplicación es el análisis cuantitativo y cualitativo.

- Cromatógrafo de líquidos UHPLC-Espectrómetro de Masas IMPACT HD (Bruker). HPLC con bomba binaria y muestreador automático acoplado a un espectrómetro de masas de tipo Cuadropolo-Tiempo de Vuelo (QTOF); ionización por Electrospray en modo positivo y negativo. Resolución 40.000 uma. El QTOF es un espectrómetro de masas de alta resolución y su principal campo de aplicación es el análisis cualitativo y de screening.
- Cromatógrafo de Líquidos con detector UV-Vis (Perkin Elmer) para el desarrollo de métodos cromatográficos.

### **Descripción del procedimiento:**

Las muestras se enviarán junto con una descripción de las mismas indicando el tipo de análisis a realizar y su posible toxicidad. A ser posible se deben indicar componentes a determinar, niveles de concentración (% , partes por millón...). Las muestras que lo necesiten se enviarán refrigeradas o congeladas. Para las muestras líquidas también se indicarán disolventes, tampones, sales, posibles contaminantes, etc.).

Para aquellas que necesiten que se lleve a cabo un tratamiento de muestra previo a su análisis por HPLC (extracción, preconcentración, purificación, derivatización), debe adjuntarse algún tipo de información que ayude al laboratorio a optimizar este proceso previo.

Posteriormente se realiza el análisis por HPLC-MS seleccionando el método optimizado (tipo de inyección, modo trabajo isocrático/gradiente, tipo de columna, temperatura de columna, flujo de fase móvil, modo de ionización (ESI+ ó ESI-), modo de adquisición de iones (fullscan, SIM, MRM, HRMS). Finalmente los resultados serán cualitativos y/o cuantitativos en función de los intereses del usuario.

Debdo a la complejidad de los equipos y de los softwares que incorporan, los equipos no funcionan en modo autoservicio; siempre será puesto en marcha por el personal técnico de la Unidad del SCAI.

## **APLICACIONES**

---

La técnica de HPLC-MS se utiliza de forma rutinaria para determinar:

- Análisis de contaminantes orgánicos en matrices agroalimentarias y medioambientales (pesticidas).
- Análisis de micotoxinas en alimentos.
- Determinación de impurezas en compuestos farmacéuticos, productos técnicos de pesticidas.
- Análisis de fitohormonas en matrices vegetales.
- Análisis de residuos zoonosanitarios.
- En general, análisis de compuestos de polaridad media y alta que se ionicen por la técnica de ionización Electrospray, tanto en modo positivo como negativo (ácidos orgánicos, aminas, compuestos fenólicos,...).

## **REFERENCIAS**

---

1. Mass Spectrometry. Principles an Applications. E. De Hoffmann, J. Charette, V. Stroobant. Wiley.
2. Chemical Ionization Mass Spectrometry. Alex. G. Harrison. CRC Press.
3. Electrospray ionization mass spectrometry. Fundamentals instrumentation & Applications. Richard D. Cole. Wiley- Interscience.
4. Applications of LC-MS in environmental chemistry. D. Barceló. Journal of chromatography library- Volume 59. Elsevier.

## Determinación de metales mediante la técnica de Plasma de Acoplamiento Inductivo acoplado a Espectrometría de Masas (ICP-MS)

### OBJETIVO

Determinación de la composición multielemental semicuantitativa y/o cuantitativa de elementos metálicos en disolución acuosa y acidulada (sean de matrices líquidas o sólidas) mediante la técnica de Plasma de Acoplamiento Inductivo acoplado a Espectrometría de Masas.

### ESTADO DEL ARTE

La técnica de Plasma de Acoplamiento Inductivo acoplado a Espectrometría de Masas (ICP/MS) es una técnica con una gran potencialidad para el análisis de elementos traza en una gran diversidad de matrices en disolución. Mediante esta técnica se pueden analizar la gran mayoría de los elementos de la Tabla Periódica, excepto H, He, C, N, O, F, Ne, Cl, S, I, Br y gases nobles, así como algunos elementos adicionales dependiendo del tipo de digestión llevada a cabo.

La muestra se introduce de forma líquida y emerge en forma de un aerosol que es guiado mediante un inyector a la base del plasma. La muestra va pasando por diferentes zonas de la antorcha del plasma que se encuentran a distintas temperaturas, sufriendo en primer lugar un proceso de secado, vaporización, atomización y, finalmente, ionización. Cuando la muestra llega finalmente a la zona analítica del plasma (formado por Ar a temperaturas entre 6000K y 7000K), se producen átomos excitados e iones que representan la composición elemental de la muestra.

La ventaja de esta técnica es que puede realizar un análisis multielemental a nivel semicuantitativo (nos da una información previa de la muestra de forma orientativa de hasta 72 elementos), ofreciendo una estimación (30%-50%) de la concentración de los elementos presentes en la muestra. Determina qué elementos son mayoritarios, minoritarios o trazas. En el caso de realizar posteriormente un análisis cuantitativo, esta información es muy útil para la decisión de los elementos a determinar, la elección del isótopo del elemento adecuado para su medida y el intervalo óptimo de la recta de calibración de cada elemento a cuantificar.

El análisis de límites de detección y/o cuantificación se ha de solicitar expresamente, ya que hay que optimizar el/los analito/s en el blanco matriz.

Intervalos de trabajo para muestras líquidas:  $\mu\text{g L}^{-1}$ -  $\text{mg L}^{-1}$ (sub-ppb a ppm).

### DISEÑO EXPERIMENTAL

#### Equipamiento.

ICP-Masas (Perkin Elmer NexionX): Equipado de sistema de introducción de muestras, ionización por plasma de Argon y detección de iones tipo cuadrupolo. Dispone de celdas de colisión/reacción para la eliminación de algunas interferencias poliatómicas.

#### Descripción del procedimiento:

Las muestras perfectamente identificadas junto con su blanco (en recipientes adecuados) deben ir acompañadas de la solicitud de ensayo rellena, disponible en la página web del SCAI ([https://www.uco.es/servicios/scal/control\\_servicios.html](https://www.uco.es/servicios/scal/control_servicios.html)) en LIMS-SCAI Solicitud de Servicios. Se podrán entregar bien por servicio de mensajería con portes pagados o bien entrega directa en la Unidad. Las muestras deberán presentarse siempre en disolución acuosa y aciduladas, preferentemente en  $\text{HNO}_3$  (cualquier otro caso, contactar con el técnico del servicio). La concentración de la mayoría de los elementos debería no superar la concentración de ppm. En caso contrario, será necesaria una dilución adecuada de la muestra. En caso de realizar un análisis cuantitativo, será necesario la realización de un análisis semicuantitativo previo. Para la obtención de patrones de calibración, en el caso del análisis de elementos más específicos, se contactará previamente con el técnico del servicio. La concentración máxima de introducción de Hg al sistema es de 20 ppb; en caso contrario, el sistema sufriría contaminación, dando lugar a un efecto memoria muy persistente. Este tipo de muestras han de sufrir un proceso previo de calefacción (preferentemente calcinación), con las medidas de seguridad adecuadas (al liberarse vapores de mercurio) para la eliminación

de dicho elemento. Las muestras, siempre que sea posible, se filtrarán. El contenido en sólidos totales (TDS) de la muestra no deberá superar las 1500 ppm con el fin de evitar la obstrucción del nebulizador y de los conos de la interfase, y no deberá presentar precipitados o sólidos en suspensión.

El equipo no funciona en modo autoservicio; siempre será puesto en marcha por el personal técnico de la Unidad del SCAI.

## **APLICACIONES**

---

- Aplicaciones medioambientales (aguas, plantas, suelos, sedimentos..).
- Control de calidad de productos agroalimentarios (aceites, vinos, bebidas espirituosas, piensos..)
- Aplicaciones biológicas (tejidos).
- Ciencias de Materiales (catalizadores, lixiviados).

## **REFERENCIAS**

---

1. Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry, A. Montasser (Wiley-VCH, Berlin, 1998).
2. Inorganic Mass Spectrometry, F. Adams, R. Gijbels and R. Van Grieken (John Wiley and sons, New York, 1988).

## Resonancia magnética nuclear en estado sólido (RMN)

### OBJETIVO

Esta técnica permite el análisis estructural de sólidos orgánicos e inorgánicos cuantificando los distintos entornos químicos del material en estudio. Se pueden detectar una gran variedad de núcleos como  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{19}\text{F}$ ,  $^{27}\text{Al}$ ,  $^{29}\text{Si}$ ,  $^{31}\text{P}$ , etc.

### ESTADO DEL ARTE

La espectroscopia de resonancia magnética nuclear es una técnica no destructiva que se fundamenta en las propiedades magnéticas de los núcleos atómicos, en base a la interacción del momento magnético nuclear con ondas de radio en presencia de un campo magnético externo que conduce a la generación de diferentes niveles energéticos.

Permite estudiar casi cualquier elemento de la tabla periódica. Los únicos núcleos que no pueden ser estudiados son aquellos que tienen un momento magnético nulo, que en la práctica son aquellos con un número másico (A, suma de protones y neutrones del núcleo) y atómico (Z, número de protones del núcleo) par (ej:  $^{12}\text{C}_6$ ,  $^{16}\text{O}_8$ ).

Cuando se aplica un campo magnético externo ( $B_0$ ) a la muestra, los núcleos activos se alinean en un determinado número de orientaciones posibles. Por ejemplo, en el caso del  $^1\text{H}$ , hay dos posibles orientaciones (paralela y antiparalela al campo magnético). El número de núcleos alineados en la posición paralela al campo externo (población alfa) es ligeramente superior a la antiparalela (población beta). Sin embargo, aplicando una fuente de radiofrecuencia puede provocarse el salto entre esos dos niveles energéticos. En teoría, la energía (o frecuencia) para provocar ese salto en los núcleos vendría dada por:

$$\nu = \frac{\gamma}{2\pi} B_0$$

donde  $\nu$  es la frecuencia de Larmor,  $\gamma$  es la razón giromagnética (que varía según el tipo de núcleo) y  $B_0$  es la intensidad del campo magnético externo. Por ejemplo, en el caso del  $^1\text{H}$ , la razón giromagnética es  $26.753 \cdot 10^7 \text{ rad/s} \cdot \text{T}$  lo que significa que si se aplica un campo magnético de  $B_0=2.3488 \text{ T}$ , la frecuencia a la que "resuena" el protón es 100 MHz. A esto es a lo que nos referimos al hablar de un equipo de 100 MHz. En nuestro caso, el equipo es de 400MHz, lo que indica que la intensidad del campo magnético externo es de unos 9.4 T. Una mayor intensidad del imán, redundaría en una mayor sensibilidad del equipo.

Sin embargo, siguiendo con el ejemplo del  $^1\text{H}$  y de nuestro imán de 9.4T, el campo magnético local "que sienten" los átomos de hidrógeno de la muestra varía un poco según el entorno químico, siendo precisamente de esa variación, de donde se extrae la información.

Desde el punto de vista práctico:

$$\nu = \frac{\gamma}{2\pi} B_0(1 - \sigma)$$

donde  $\sigma$  es la constante de apantallamiento, que depende del entorno químico. Los datos de RMN se expresan en los llamados desplazamientos químicos, que representan la diferencia entre la frecuencia de resonancia de un determinado núcleo y otro tomado como referencia. Además, los desplazamientos químicos se expresan en la escala en delta según:

$$\delta = \frac{\nu - \nu_{ref}}{\nu_{ref}} 10^6$$

donde  $\nu$  y  $\nu_{ref}$  son las frecuencias de resonancia de la muestra y la referencia, respectivamente.

En un experimento de muestras sólidas las principales interacciones que nos podemos encontrar son: Zeeman, dipolar, cuadrupolar (para núcleos con  $I > 1/2$ ) y anisotropía del desplazamiento químico.

Con el fin de obtener espectros con buena resolución se suelen aplicar distintas técnicas y/o secuencias de pulso: Magic angle spinning (MAS, consistente en girar la muestra  $54.74^\circ$  respecto al campo magnético externo), crossed polarization-magic angle spinning (CP-MAS, consistente en la transferencia de polarización de los protones a los núcleos más insensibles cercanos), Multiple Quantum Magic Angle Spinning (MQMAS, para núcleos con momento cuadrupolar) etc.

## DISEÑO EXPERIMENTAL

---

### Equipamiento.

- Espectrómetro de RMN Bruker Avance III HD 400 WB.
- Sonda CP/MAS de 4mm de doble canal: N- P/F-H.
- Sonda CP/MAS de 3,2 mm de doble canal: N-P/F-H.
- Sonda CP/MAS de 7 mm de doble canal para núcleos de baja  $\gamma$ .

### Descripción del procedimiento:

Las muestras se deben entregar en el laboratorio finamente molidas, y no debe contener núcleos paramagnéticos. La cantidad de muestra dependerá de la sonda que se vaya a utilizar: entre 20-200 mg. Para la adquisición del espectro de RMN la muestra se introducirá en el rotor correspondiente y se girará a la velocidad adecuada dependiendo del estudio que se requiera.

El tiempo de adquisición final dependerá de la relación señal/ruido que se precise; los principales factores que influyen en este aspecto son: núcleo a adquirir, número de acumulaciones, tiempo de relajación, cantidad de muestra, concentración del isótopo a estudiar en la muestra, etc.

Al ser una técnica no destructiva la muestra se puede recuperar.

## APLICACIONES

---

La técnica de RMN se utiliza de forma rutinaria para determinar:

- Análisis estructural de moléculas inorgánicas, orgánicas y organometálicas.
- Estudios de mecanismos de reacción.
- Estudios de macromoléculas.
- Obtención de parámetros físicos.
- Control de impurezas.

Los principales áreas donde se está aplicando la RMN en estado sólido son:

- Baterías.
- Polímeros.
- Cristalografía.
- Catálisis.
- Ciencias de la vida: farmacéutica, compuestos orgánicos...
- Caracterización de suelos.

## REFERENCIAS

---

- Bruker [www.Bruker.es](http://www.Bruker.es)
- Textos sobre RMN <http://www.ebyte.it/library/refs/MROnlineTexts.html>

## Espectroscopia electrónica de rayos X (XPS) y Auger (AES)

### OBJETIVO

Caracterización de superficies de materiales sólidos. Suministro de información cualitativa y semicuantitativa de la composición superficial, del estado de oxidación y/o entorno químico de los diferentes elementos que componen el material.

### ESTADO DEL ARTE

La técnica de Espectroscopía Fotoelectrónica de Rayos-X (*X-Ray photoelectron spectroscopy*, XPS) es una técnica espectroscópica desarrollada por K Siegbahn y su grupo de investigación a mediados de la década de los 60. Esta basada en el efecto fotoeléctrico, donde un fotón al incidir en una superficie provoca la extracción de un electrón. En XPS las fuentes de rayos X más comunes son la de Al K $\alpha$  (1486.6 eV) y la de Mg K $\alpha$  (1253.6 eV). Es una técnica superficial debido al corto recorrido de los fotones a través de la superficie.

Los espectros XPS se obtienen cuando una muestra es irradiada por rayos X al tiempo que se mide la energía cinética (usando un CHA *Concentric Hemispherical Analyser*) y el número de electrones que escapan de la superficie del material analizado como consecuencia de la radiación incidente, lo que genera un espectro con una serie de señales características de cada elemento presente en la superficie. El perfil y la energía de enlace de cada señal cambiará ligeramente en función del estado químico del elemento del que sale el electrón.

Para registrar un espectro de XPS se requieren condiciones de ultra-alto vacío debido a que a presiones mayores la contaminación superficial impide el análisis de la superficie del material que realmente se quiere analizar.

En esta técnica se pueden detectar todos los elementos de la tabla periódica excepto el hidrógeno y el helio.

De manera simultánea (o independientemente) al registrar un espectro XPS también tendremos señales Auger que aportan información sobre la composición de las capas superficiales.

### DISEÑO EXPERIMENTAL

#### Equipamiento.

Espectrómetro de fotoelectrones de rayos X (XPS) SPECS mod. PHOIBOS 150 MCD con 9 channeltrons y una fuente de rayos X con ánodos de Mg y Al y otra fuente monocromática de Al y Ag.

Incluye un cañón de iones Ar<sup>+</sup> para poder realizar perfiles de profundidad. Una cámara de reacción para tratamientos con diferentes gases hasta 800 °C.

#### Descripción del procedimiento:

La muestra a analizar debe consistir en un sólido con unas dimensiones máximas de 13 mm de radio.

Para muestras en polvo estas deben prensarse previamente. Para muestras que no puedan ser compactadas ponerse en contacto con el personal de la unidad.

Las muestras han de entregarse en la Unidad el día anterior a la realización del análisis para que pueda ser desgasificada e introducida en la cámara de análisis y que ésta alcance la presión de operación.

Salvo que se tenga una idea clara de la medida a realizar, inicialmente se realizará un barrido general de la muestra lo que permitirá identificar los elementos mayoritarios presentes en la superficie en estudio. Posteriormente, en función de los intereses del usuario, se podrán realizar medidas de zonas concretas realizando tantas acumulaciones espectrales como la naturaleza y/o concentración de la muestra requieran.

## APLICACIONES

---

La técnica de XPS se utiliza de forma rutinaria para determinar:

- Análisis cualitativo y semi-cuantitativo de los elementos presentes en la superficie del sólido (1-10 nm)
- Tipo de contaminación o especies fuertemente adsorbidas en la superficie de la muestra.
- Identificación del estado químico (estado de oxidación) de uno o varios de los elementos presentes en la muestra.
- Identificación del entorno químico (enlaces) de los elementos presentes en la muestras.

## REFERENCIAS

---

- UK Surface Analysis Forum <http://www.uksaf.org/>
- NIST X-ray Photoelectron Spectroscopy Database <http://srdata.nist.gov/xps/>
- SPECS <http://www.specs.de>

## CHNS elemental analysis in agricultural and chemical samples by using a combustion method.

### OBJETIVE

Elemental analysis of carbon, hydrogen, nitrogen and sulfur (CHNS) in agricultural and chemical samples by a combustion method.

### BASIC PRINCIPLES

A CHNS elemental analysis provide a means for the rapid determination of C, H, N and/or S in organic and inorganic matrices. It is capable of handling a wide variety of sample types (including solids, liquids and viscous samples) in the fields of agricultural, food, chemicals, environment, pharmaceuticals and energy.

This simultaneous CHNS analysis requires high temperature combustion in an oxygen-rich environment and is based on the classical Dumas method. In this combustion process (furnace  $T^a$  around  $1000^{\circ}\text{C}$ ), carbon is converted to carbon dioxide; hydrogen to water; nitrogen to nitrogen gas/ oxides of nitrogen and sulphur to sulphur dioxide. The combustion products are swept out of the combustion chamber by inert carrier gas (helium) and passed over heated high purity copper. The function of this copper is to remove any oxygen not consumed in the initial combustion and to convert any oxides of nitrogen to nitrogen gas. The gases are then passed through the absorbent traps in order to leave only carbon dioxide, water, nitrogen and sulphur dioxide.

Detection of the gases can be carried out by a gas chromatography (GC) separation followed by quantification using thermal conductivity detection (TCD) of individual compounds. Quantification of the elements requires calibration for each element by using high purity analytical standard compounds such as acetanilide, benzoic acid or BBOT. The CHNS elemental contents are reported in weight percent and the detection limits for this analysis is around 0.2%.

### INSTRUMENTATION

**Equipment.** There are 2 instruments at the SCAI to develop the CHNS elemental analysis of samples:

- A EuroVector Elemental Analyser EA3000 (EuroVector SpA, Milan, Italy) for CHNS microanalysis of samples (between 0,5 and 10 mg per sample).
- A EuroVector Elemental Analyser EA3000 (EuroVector SpA, Milan, Italy) for CN macroanalysis of samples (above 20 mg per sample).

Both of them are equipped with Callidus software (EuroVector SpA, Milan, Italy) for running the instrument, storing the data, and for processing the results obtained.

#### **Procedure:**

Before the CHNS analysis, samples must be dried and fine crushed. Every sample is weighed in a tin capsule by using a microbalance. After that, the tin capsule with the sample is sealed to avoid the air inside of the capsule. This procedure should be developed in a selfservice mode, assisted by technical staff of the SCAI, when it is necessary to analyze a large number of samples. In this case, sample are placed in a carousel type to use an autosampler.

Each sample is combusted in a reactor at about  $1000^{\circ}\text{C}$  in a temporarily enriched oxygen atmosphere. The combustion products are carried by a carrier gas (helium) that passes through a glass column packed with an oxidation catalyst and a copper reducer. At this temperature, the nitrogen oxides are reduced to  $\text{N}_2$ . The  $\text{N}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CO}_2$ , and  $\text{SO}_2$  are then transported by the helium to a packed column, separated by GC and quantified with a TCD detector (set at  $90^{\circ}\text{C}$ ).

Previously, the chromatographic responses for each element are calibrated against standards weighed and analyzed by technical staff of the SCAI. The chemical standard used to develop the calibration curves depend of the type of sample to analyse. The CHNS chromatografic areas for each sample are applied to the calculated calibration curve to obtain the CHNS composition. These elemental contents are reported in weight percent.

## APPLICATIONS

---

CHNS elemental analysis is used extensively across a wide range of applications such us:

- Determination of nitrogen (as a surrogate for protein) in agricultural and food samples.
- Determination of C/N ratio, total carbon (TC) and total organic carbon (TOC) in soils.
- Quantitative analysis of total CHN and/or S in chemical samples.
- Determination of total N and C in fuels and biofuels.

## REFERENCES

---

1. Cereal protein analysis via Dumas method: standardization of a micro-method using the EuroVector Elemental Analyser. Serrano, S., Rincón, F. and García-Olmo, J. *Journal of Cereal Science* 58,1 (2013) 31-36. D.O.I.: 10.1016/J.JCS.2013.04.006.
2. AMC Technical Brief No 29, CHNS Elemental Analysers, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, 2008.
3. ASTM D5291-10, Standard Test Methods for Instrumental Determination of Carbon, Hydrogen, and Nitrogen in Petroleum Products and Lubricants, ASTM International, West Conshohocken, PA, 2010.

# Área de MICROSCOPIA

## MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO Y MICROANÁLISIS

- Obtención de imágenes de gran resolución y profundidad de campo de la superficie de muestras de tipo biológico e inorgánico mediante Microscopia Electrónica de Barrido (SEM). Composición elemental

## MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN

- Obtención de imágenes y composición elemental de la estructura de materiales y ultraestructura biológica a escalas micrométricas y nanométricas, mediante Microscopia Electrónica de Transmisión, TEM

## MICROSCOPIA CONFOCAL

- Estudio y obtención de imágenes tridimensionales de las muestras con fluorescencia mediante microscopía confocal

## PREPARACIÓN DE MUESTRAS Y ULTRAMICROTOMÍA

- Preparación de muestras biológicas para su observación al microscopio electrónico de transmisión (cortes ultrafinos) y microscopio óptico (cortes semifinos).
- Preparación de muestras biológicas para su observación al microscopio electrónico de barrido (SEM)
- Preparación de muestras de materiales para su observación en microscopía

## Obtención de imágenes de gran resolución y profundidad de campo de la superficie de muestras de tipo biológico e inorgánico mediante Microscopia Electrónica de Barrido (SEM). Composición elemental.

### OBJETIVO

Obtención de imágenes de la morfología externa de una muestra, bastante similares en apariencia a las percibidas por el ojo proporcionando imágenes basadas principalmente en el contraste topográfico. Se trata, por tanto, de una técnica que permite observar y estudiar superficies de un área muy reducida de cualquier tipo de material, bien sea orgánico o inorgánico, sin necesidad de pasar por procesos de preparación muy complejos, ya que los requerimientos más importantes son que la muestra esté deshidratada y sea eléctricamente conductora.

Además, se puede obtener información adicional mediante técnicas asociadas como la espectroscopia de dispersión de energía de rayos X (X-EDS) que proporcionan información sobre la composición elemental de la muestra.

### ESTADO DEL ARTE

La técnica se basa en bombardear una muestra con un haz focalizado de electrones. Las señales producidas por la interacción entre los átomos y el haz electrónico son captadas por diferentes tipos de detectores.

El equipamiento actual consta de un detector de electrones secundarios (SE) que proporciona imágenes topográficas de la superficie de la muestra, un detector de electrones retrodispersados (BSE) que proporciona imágenes en escala de grises relativas a los elementos constituyentes de la muestra, un detector por dispersión de energías de rayos X (EDS) que permite el análisis cualitativo y semicuantitativo de los elementos constituyentes de la muestra.

Una de las características que mejor define a la microscopía electrónica de barrido es su excelente poder de resolución (3,5 nm) que unido a la gran profundidad de campo y al efecto de sombreado la convierten en una herramienta de un alto potencial a la hora de realizar análisis tridimensionales de estructuras.

### DISEÑO EXPERIMENTAL

#### Equipamiento.

La unidad dispone del siguiente equipamiento:

- Microscopio Electrónico de Barrido JEOL JSM 6300
  - Voltaje de aceleración: de 0.2 a 30 kv.
  - Magnificación: de 10x a 300.000x (wd = 39 mm).
  - Resolución:
    - Con electrones secundarios 3.5 nm (a 30 kv, wd =8 mm).
    - Con electrones retrodispersados 10.0 nm (a 30 kv, wd =8 mm).
  - Está equipado con un Sistema de microanálisis X-act 80
    - Detector de SiLi tipo de ventana ( ATW2 ).
    - Rango de detección: Del boro al uranio.
    - Resolución: 137 eV.
  - El software permite el análisis cualitativo y semicuantitativo, mapeado de elementos, distribución elemental en una línea de barrido, comparación de espectros etc...
  
- Microscopio Electrónico de barrido JEOL JSM 7800F
  - Voltaje de aceleración: de 0.5 a 30 kv.

- Magnificación: de 10x a 1.000.000x
- Resolución:
  - Con electrones secundarios 0.8 nm (a 15 kv, GB mode).
- Está equipado con un Sistema de microanálisis X-max 150
  - Detector de SiLi tipo de ventana ( ATW2 ).
  - Rango de detección: Del boro al uranio.
  - Resolución: 127 eV .
- El software permite el análisis cualitativo y semicuantitativo, mapeado de elementos, distribución elemental en una línea de barrido, comparación de espectros etc...

### **Procedimiento.**

Los equipos contarán con un técnico encargado del mantenimiento, coordinación y control diario de su uso, así como de cubrir necesidades especiales de utilización.

Los equipos funcionan en modo de autoservicio, asistido por el personal técnico del SCAI. Los usuarios realizarán sus reservas mediante contacto telefónico con el responsable del equipo (teléfono: 957 218734).

Es fundamental que las muestras que vayan a ser observadas en el microscopio SEM estén deshidratadas y sean conductoras, en caso contrario se podrán preparar en la unidad de preparación de muestras y ultramicrotomía.

Los ficheros de imágenes y datos obtenidos se enviarán al servicio de consigna de la UCO, quedando limitado el almacenamiento en el disco duro de los ordenadores del Servicio a 15 días, tiempo tras el cual se procederá al borrado de los mismos.

## **APLICACIONES**

---

La microcopia electrónica de barrido se utiliza de forma rutinaria para determinar:

- Investigación en general en ciencias Biomédicas, Geológicas, Químicas, Físicas.
- Estudio químico y estructural de obras de arte, alteración de monumentos, control de calidad...
- Investigaciones geomineras, cristalográficas, mineralógicas y petrológicas.
- Control de calidad y estudio de fatiga de materiales.
- Valoración del deterioro de materiales.
- Control de materiales mediante observación de superficies.
- Determinación de la morfología de los materiales.
- Estudio y caracterización de sustancias desconocidas.
- Determinación de tamaño y forma de partículas.
- Estudio de la presencia de defectos en materiales de construcción, semiconductores, etc..
- Microanálisis de elementos en superficies, desde el boro al uranio.

## **REFERENCIAS**

---

1. Scanning electron microscopy and X-ray microanalysis. Goldstein, J. I.; Newbury, D. E.; Echlin, P.; Joy, D. C.; Fiori, C.; Lifshin, E. ISBN 0-306-40768-X
2. Procedures in electron microscopy. A.W. Robards, A.J. Wilson. ISBN 0-471-92853-4
3. Métodos de microscopía electrónica de barrido en biología. J.L. Ojeda Sahagún. ISBN 84-8102-164-4

## Obtención de imágenes y composición elemental de la estructura de materiales y ultraestructura biológica a escalas micrométricas y nanométricas, mediante Microscopia Electrónica de Transmisión, TEM.

### OBJETIVO

Obtención de imágenes en el espacio real junto con diagramas de difracción de electrones, que dan información sobre morfología, tamaño de muestra, orientación, grado de cristalinidad y perfiles de distribución de tamaño. Además, se puede obtener información adicional mediante técnicas asociadas como la espectroscopia de dispersión de energía de rayos X (X-EDS) que proporcionan información sobre la composición elemental de la muestra.

### ESTADO DEL ARTE

En el microscopio electrónico de transmisión (TEM) se irradia una muestra delgada con un haz de electrones de densidad de corriente uniforme, cuya energía está dentro del rango de 80 a 200 kV. Parte de esos electrones son transmitidos, otra parte son dispersados y otra parte da lugar a interacciones que producen distintos fenómenos. Todas estas señales se pueden emplear para obtener información sobre la naturaleza de la muestra (morfología, composición, estructura cristalina, estructura electrónica, etc.).

El microscopio electrónico de transmisión emplea la transmisión/dispersión de los electrones para formar imágenes, la difracción de los electrones para obtener información acerca de la estructura cristalina y la emisión de rayos X característicos para conocer la composición elemental de la muestra.

Este microscopio permite conocer la ultraestructura de células y tejidos, tanto animales como vegetales. Cuando además se realizan técnicas inmunocitoquímicas, es posible obtener información acerca de la localización ultraestructural de determinadas moléculas.

En cuanto a las muestras inorgánicas se puede determinar su morfología, forma dimensiones y posición de microcristales o partículas, cristalografía, posición de los planos cristalinos, estudio de los defectos, etc.

Con el analizador de energías dispersivas se puede, además, determinar la composición elemental de la muestra.

### DISEÑO EXPERIMENTAL

**Equipamiento.** Los equipos disponibles son microscopio electrónico de transmisión de 120 Kv Jeol 1400

- Microscopio Electrónico de Transmisión JEOL JEM 1400
  - Resolución: 0.38 nm entre puntos.
  - Voltaje de aceleración: 80, 100, 120 kv.
  - Magnificación: Alta de 200x a 1.200.000x.
  - Sistema STEM para mapping de rayos.
- Microscopio Electrónico de Transmisión de alta resolución JEOL JEM 2010
  - Resolución: 0.194 nm entre puntos.
  - Voltaje de aceleración: 80, 100, 120, 160, y 200 kv.
  - Magnificación: 2000x a 1.500.000x en 30 pasos.
  - Difracción: selected area, microbeam, high dispersion.
- Ambos microscopios Incorporan un Sistema de microanálisis Inca Energy 200 TEM:
  - Rango de detección: Del boro al uranio.
  - Resolución: 136 eV
  - El software permite el análisis cualitativo y semicuantitativo, mapeado de elementos, distribución elemental en una línea de barrido, comparación de espectros, etc...

**Descripción del procedimiento:** Los equipos contarán con un técnico encargado del mantenimiento, coordinación y control diario de su uso, así como de cubrir necesidades especiales de utilización.

Los equipos funcionan en modo de autoservicio, asistido por el personal técnico del SCAI. Los usuarios realizarán sus reservas mediante contacto telefónico con el responsable del equipo (teléfono: 957 218734).

Es fundamental que las muestras que vayan a ser observadas en TEM estén deshidratadas y sean lo más delgadas posible, por debajo de 100 nm de grosor. Además deben ir soportadas sobre una rejilla de 3.05 mm de diámetro.

Los ficheros de imágenes y datos obtenidos se enviarán al servicio de consigna de la UCO, quedando limitado el almacenamiento en el disco duro de los ordenadores del Servicio a 15 días, tiempo tras el cual se procederá al borrado de los mismos.

## APLICACIONES

---

La microscopía electrónica de transmisión se utiliza de forma rutinaria para determinar:

- Análisis semi-cuantitativo de los elementos presentes en la muestra.
- Estudio de la morfología, estructura y composición de partículas finas y nanomateriales.
- Estudio ultraestructural de células y tejidos normales y patológicos.
- Caracterización inmunocitoquímica e histoquímica de distintos tipos celulares.

## REFERENCIAS

---

1. Transmission electron microscopy. A textbook for materials science. David B. Williams C. Barry Carter ISBN 978-0-387-76500-6
2. X-Ray and image analysis in electron microscopy John J. Friel. ISBN 0-9641455-0-2
3. Procedures in electron microscopy. A.W. Robards, A.J. Wilson. ISBN 0-471-92853-4

## Estudio y obtención de imágenes tridimensionales de las muestras con fluorescencia mediante microscopía confocal

### OBJETIVO

Posibilidad, mediante el microscopio confocal, de obtener imágenes de “secciones ópticas” de las muestra a las que previamente se les ha añadido un fluorocromo o disponen de fluorescencia natural.

### ESTADO DEL ARTE

El fundamento de un microscopio confocal es, en esencia, el mismo que el de un microscopio óptico, con la diferencia de que posee como fuente de luz un láser y un sistema electrónico que ayuda a la captación de imágenes. Gracias a ello se consigue por un lado un aumento en la resolución y por otro la obtención de imágenes de secciones ópticas extremadamente finas, eliminando así la interferencia que produce la luz que llega de los diferentes campos ópticos de todo el grosor de la muestra que se observa, consiguiendo así que el enfoque se realice sobre un único plano (confocal).

### DISEÑO EXPERIMENTAL

**Equipamiento.** Microscopio confocal Leica DM IRE 2, software LCS (Leica Confocal Software), escáner, diferentes tipos de láser: azul (405nm), Ar/ArKr o verde (458nm, 476nm, 488nm, 496nm), HeNe o rojo (594nm, 633nm)

**Descripción del procedimiento:** Las muestras serán colocadas sobre un portaobjetos. Éstas deben tener un grosor entre 10-100um (semifinos) y el cubreobjetos que se use para el montaje debe tener un grosor no mayor a 0.17mm. Estas muestras serán componentes celulares o tisulares que pueden verse asociados a proteínas o anticuerpos. Pueden ser muestras caracterizadas por una fluorescencia natural (fluorescencia primaria o autofluorescencia) como en la clorofila. Si no fuese el caso, es preciso teñirla con un marcador fluorescente o fluorocromo (fluorescencia secundaria) caracterizado con un espectro de emisión o excitación específico. Finalmente añadimos a la muestra una gota de aceite de inmersión para su visualización en el microscopio.

El equipo funciona en modo de autoservicio, asistido por el personal técnico del SCAI.

**NOTA: EN ESTOS MOMENTOS SÓLO ESTÁ CAPACITADO PARA LA DOCENCIA HASTA LA ADQUISICIÓN DEL NUEVO EQUIPO (PREGUNTAR AL TÉCNICO)**

### APLICACIONES

Las principales aplicaciones del microscopio confocal son:

- Análisis de colocalización
- Observación de marcados inmunocitoquímicos y detección de sondas
- Estudio de estructura celular y citoesqueleto
- Medida de actividad intracelular (pH e iones)
- Producción de reconstrucciones tridimensionales (series Z)
- Permite la visualización de series temporales

### REFERENCIAS

1. Microscopía láser confocal. Servicio de procesos de imágenes (Universidad de Oviedo). Ángel Martínez Nistal.
2. Protocolo sesión de trabajo microscopio confocal Leica DM IRE 2 (MIC-15). Servicio Central de Apoyo a la Investigación (Universidad de Córdoba)

## Preparación de muestras biológicas para su observación al microscopio electrónico de transmisión (cortes ultrafinos) y microscopio óptico (cortes semifinos).

### OBJETIVO

Preparación de muestras biológicas y células en suspensión para una correcta visualización en el microscopio óptico y electrónico de transmisión (TEM) (muestras deshidratadas, fijadas, incluidas en bloque homogéneo de resina, cortadas y teñidas o contrastadas).

### ESTADO DEL ARTE

Para la obtención de una imagen óptima en el microscopio electrónico de transmisión, la muestra debe ser sometida a un proceso previo de preparación. Durante este proceso se fijará la cadena de lípidos de la membrana plasmática mediante una postfijación con tetróxido de osmio que, además, da al espécimen una coloración negra característica que facilita su visibilidad para el resto del procedimiento.

Es requisito indispensable que la muestra objeto de estudio esté deshidratada. Sin embargo, la totalidad del material biológico a observar, posee un alto contenido de agua. Si el agua se eliminara mediante secado al aire se producirían graves daños en la estructura morfológica de las células por efecto de la tensión superficial en la interfase aire-agua. Para que esto no ocurra, las muestras se deshidratan sometiéndose a una escala ascendente de acetonas, evitándose que el material biológico se colapse y, así, mantenga su superficie intacta. Posteriormente, a las muestras se les añade óxido de propileno a diferentes proporciones, líquido totalmente hidrófobo y que es solvente de la resina que es el medio en el que se incluirá definitivamente la muestra. El óxido de propileno actúa así como intermediario entre la deshidratación y la inclusión en resina favoreciendo la entrada de ésta en toda la muestra.

La resina da consistencia a la muestra para el corte en el ultramicrotomo. Concretamente, en nuestras instalaciones, disponemos de resina epon (Epon 812®, Fluka Chemie, AG, Buchs, Suiza) la cual forma un polímero tridimensional estable al calor y a los solventes. La polimerización es irreversible y uniforme. Las ventajas de la utilización de esta resina son que mantiene la ultraestructura, sufre poca contracción y dispone de una alta viscosidad.

Finalmente, se cortan los bloques de resinas con el ultramicrotomo en secciones semifinas para la visualización al microscopio óptico y se colocan en portaobjetos, o ultrafinas para la visualización al microscopio electrónico de transmisión y se colocan en rejillas de níquel o cobre. Los cortes semifinos se tiñen con azul de toluidina, mientras que las rejillas se ponen en contacto con una combinación de acetato de uranilo y citrato de plomo que modifica el peso molecular de las diferentes estructuras de la muestra dando lo que denominamos “contraste”, necesario para su visualización en el microscopio electrónico de transmisión.

### DISEÑO EXPERIMENTAL

**Equipamiento.** Los equipos necesarios para el proceso son: ultramicrotomo Leica Ultracut R (MIC-09), crioultramicrotomo RMC Power Tome (MIC-31)\*, procesador EM-TP LEICA (MIC-28)\*, estufa Selecta (MIC-12), contrastador AC-20 Leica (MIC-30)\*, piramidotomo LEICA EM-TXP (MIC-29)\*, campana extractora Nublar NBL-1300 (MIC-16), placa caliente Selecta PACTRO NIC S156/1001 (MIC-14) y frigorífico Nevir NVR 4352 DD (MIC-26).

\*Nueva equipación

#### **Descripción del procedimiento:**

Es importante que el usuario entregue las muestras fijadas en glutaraldehído donde han tenido que permanecer un mínimo de 2 horas y un máximo de 3 meses, siempre en el frigorífico entre 3 y 10°C.

Posteriormente, se procede al lavado del fijador utilizando H<sub>2</sub>O destilada.

A continuación, se realiza una postfijación con tetróxido de osmio al 1 ó 2% y, después, se lava nuevamente el fijador.

Seguidamente, comienza el proceso de deshidratación por inmersión en acetona siguiendo una escala ascendente de concentración: 30%, 50%, 70%, 90% y 100%.

Para poder conseguir que la resina penetre en la muestra, previamente se necesita un intermediario, por lo que se sustituye la inmersión en acetona por la inmersión en óxido de propileno.

Finalmente, se realizan pases en resina diluida en óxido de propileno en diferentes proporciones hasta que quede resina pura y, una vez en ésta, las muestras permanecen 24 horas en la estufa a unos 50°, aproximadamente, para que la resina polimerice y forme el bloque.

Posteriormente, se procede al corte del bloque en el ultramicrotomo:

- 1) Cortes semifinos (si se va a observar en el microscopio óptico): de 400nm de grosor que se colocan en portaobjetos y se tiñen con azul de toluidina.
- 2) Cortes ultrafinos (si se quiere observar en el microscopio electrónico de transmisión): de 80 nm de grosor que se colocan en rejillas de níquel y cobre y se contrastan con acetato de uranilo y citrato de plomo.

## **APLICACIONES**

---

Permite la visualización y el estudio de las muestras biológicas en el microscopio óptico y electrónico de transmisión obteniéndose una imagen óptima sin daños para la muestra ni para el microscopio.

## **REFERENCIAS**

---

1. Microscopía. César E. Montalvo Arenas. Agosto 2010
2. Principios y prácticas de la microscopía electrónica. Prof. Viviana Sorivas de Lozano, Ing. María Julia Yañez, Dra. Alfonsina Morales. Primera edición (2/10/2014)
3. Protocolos: inclusión de muestras en epoxyresinas (MIC-01); protocolo ultramicrotomía (MIC-04); protocolo contraste de muestras (MIC-05) y protocolo cortes semifinos (MIC-03). Servicio Central de Apoyo a la Investigación (Universidad de Córdoba)

## Preparación de muestras biológicas para su observación al microscopio electrónico de barrido (SEM)

### OBJETIVO

Preparación de muestras para una correcta visualización en el microscopio electrónico de barrido, SEM (muestras deshidratadas y conductoras).

### ESTADO DEL ARTE

Para la obtención de una imagen óptima en el microscopio electrónico de barrido, la muestra debe ser sometida a un proceso previo de preparación. Es requisito indispensable que la muestra objeto de estudio esté deshidratada. Sin embargo, la totalidad del material biológico a observar, posee un alto contenido de agua. Si el agua se eliminara mediante secado al aire se producirían graves daños en la estructura morfológica de las células por efecto de la tensión superficial en la interfase aire-agua. Para que esto no ocurra, las muestras se deshidratan sometiéndose a una escala ascendente de acetonas y, posteriormente, a través de la técnica del secado hasta el punto crítico, en la que se sustituye el solvente de deshidratación por un gas en su estado líquido (CO<sub>2</sub>) que pasa al estado gaseoso sin pasar por el estado sólido (esto se consigue aplicándole una determinada presión y a una temperatura específica). Este proceso evita que el material se colapse y mantenga su superficie intacta con todos los relieves que tuvo al estado natural. A continuación, las muestras se colocan en soportes de cobre mediante cintas o pinturas conductoras que favorecen la conductividad de los electrones. Asimismo, para lograr todavía más una mejor conducción y, además, una protección de la muestra ante la proyección de los electrones, se procede al recubrimiento con una fina capa de oro o carbono mediante un sistema de pulverización al vacío. De esta manera, la superficie de la muestra está preparada para recibir los electrones, reflejarlos o emitir electrones secundarios.

### DISEÑO EXPERIMENTAL

**Equipamiento.** Los equipos necesarios para el proceso son: secador de punto crítico Balzers CPD 030 (MIC-24), campana extractora Nublar NBL-1300 (MIC-16), sombreador de oro BAL-TEC SCD 005 (MIC-22), Sombreador de oro/carbono de alto vacío AC-600 Leica (MIC-27)\*, procesador EM-TP Leica (MIC-28)\* y frigorífico Nevir NVR 4352 DD (MIC-26).

#### **Descripción del procedimiento:**

Es importante que el usuario entregue las muestras fijadas en glutaraldehído donde han tenido que permanecer un mínimo de 2 horas y un máximo de 3 meses, siempre en el frigorífico entre 3 y 10°C.

Posteriormente, se procederá a lavar el fijador utilizando H<sub>2</sub>O destilada.

A continuación, comienza el proceso de deshidratación por inmersión en acetona en una escala ascendente de concentración: 30%, 50%, 70%, 90% y 100%.

Para mayor deshidratación, se sustituye la acetona por CO<sub>2</sub> mediante el secador de punto crítico (no todas las muestras serán sometidas a este procedimiento, dependerá de la fragilidad de las mismas).

Finalmente, las muestras se colocan en soportes de cobre con una cinta conductora (de carbono, cobre o aluminio) o pintura conductora (de plata o carbono) y se recubren de oro o carbono.

NOTA: este proceso puede sufrir algún cambio puntual si así lo requiere el usuario y es conveniente para la muestra, siempre y cuando el laboratorio pueda asimilar dicho cambio puntual (consultar previamente con el técnico).

### APLICACIONES

Permite la visualización y estudio de muestras biológicas en el microscopio de barrido obteniendo una imagen óptima sin daños para las muestras ni para el microscopio.

## REFERENCIAS

---

1. Microscopía. César E. Montalvo Arenas. Agosto 2010
2. Principios y prácticas de la microscopía electrónica. Prof. Viviana Sorrivias de Lozano, Ing. María Julia Yañez, Dra. Alfonsina Morales. Primera edición (2/10/2014)
3. Protocolos: preparación de muestras MEB (MIC-06); protocolo de desecación por punto crítico (MIC-07); protocolo recubrimiento de oro (MIC-08). Servicio Central de Apoyo a la Investigación (Universidad de Córdoba)

## Preparación de muestras de materiales para su observación en microscopía

### OBJETIVO

Equipos que ayudan a la preparación de muestras de materiales para una correcta visualización tanto en microscopía electrónica como microscopía de fuerza atómica

### ESTADO DEL ARTE

Podemos encontrar diversos problemas cuando decidimos trabajar en microscopía con ciertos materiales para los cuales, en ocasiones, se requiere de herramientas o equipos que complementen dicha preparación como pueden ser sierras, tallados, pulidos, portamuestras específicos...

En microscopía estamos provistos de equipos que incorporan algunas de estas herramientas siendo posible, por ejemplo, corte de algún material de gran dureza mediante sierras para reducir su tamaño o poder visualizar la estructura interna del mismo (muy útil para microscopía de barrido), corte de polímeros cuya consistencia requiere de un sistema de congelación para poder apreciarlo en microscopía de transmisión (crioultramicrotomía). Así mismo, podemos facilitar portamuestras de hasta 4 insertos planos o verticales para poder trabajar con microscopía de fuerza atómica ofreciendo la posibilidad de pulir la muestra sin necesidad de embutirlo en resina trabajando bajo una lupa para poder ceñirnos a un área de interés específico y con la posibilidad de combinar dicho pulido con cuchilla de vidrio en ultramicrotomía para asegurar una muestra completamente plana. Finalmente, nuestros equipos de sombreado (alto vacío o bajo vacío) podemos apreciar mejores imágenes gracias a una capa más fina de recubrimiento de oro u ofrecer mejores resultados en microanálisis mediante un recubrimiento de carbono.

### DISEÑO EXPERIMENTAL

**Equipamiento.** Los equipos necesarios para el proceso son: ultramicrotomo Leica Ultracut R (MIC-09), crioultramicrotomo RMC Power Tome (MIC-31)\*, piramidotomo LEICA EM-TXP (MIC-29)\*, sombreador de oro/carbono de alto vacío AC-600 Leica (MIC-27)\*.

\*Nueva equipación

#### **Descripción del procedimiento:**

Las muestras no deben medir más de los 0,8 x 0,6 cm de tamaño para pulido, tallado, corte o congelación (un tamaño mayor, debe ser consultado previamente con el técnico) Para soportes de microscopios de fuerza atómica, el tamaño debe ser menor. A continuación, se colocan en el portamuestras indicado y, gracias al piramidotomo, podemos hacer uso de diferentes sierras, fresas para tallado y capas de pulido (con diferentes grosores y/o precisión de pulido según se requiera), además, gracias al ultramicrotomo, podemos afinar el pulido mediante la cuchilla de vidrio. Si se desea cortar un polímero de consistencia flexible para transmisión, tenemos la posibilidad de congelar el material para conseguirlo gracias al crioultramicrotomo del que disponemos. Finalmente, las muestras destinadas al microscopio de barrido, deben ser recubiertas de oro para dar imágenes óptimas o de carbono para un microanálisis más claro para lo que se requiere recibir las muestras previamente al día de su visualización al microscopio.

### APLICACIONES

Permite la visualización óptima y el estudio de las muestras químicas o de materiales en el complejo campo de la microscopía.

### REFERENCIAS

1. Principios y prácticas de la microscopía electrónica. Prof. Viviana Sorriveras de Lozano, Ing. María Julia Yañez, Dra. Alfonsina Morales. Primera edición (2/10/2014)
2. Protocolos: protocolo ultramicrotomía; protocolo piramidotomo; protocolo especial para mezclas poliméricas; protocolo recubrimiento de oro y/o carbono de alto o bajo vacío. Servicio Central de Apoyo a la Investigación (Universidad de Córdoba)



# Área de IMAGEN CIENTÍFICA

## UNIDAD DE TÉCNICAS GEOESPACIALES

- Obtención de una nube de puntos de alta densidad mediante un Láser Escaner

## Obtención de una nube de puntos de alta densidad mediante un Láser Escaner

### OBJETIVO

El propósito de un escáner 3D es crear una nube de puntos (representación discreta) de una superficie continua. Estos puntos pueden utilizarse para extrapolar la forma del objeto mediante procesos de reconstrucción 3D. También se recoge información de la intensidad de rebote del haz de luz láser en cada uno de los puntos. Si se recoge adicionalmente la información del color en cada punto, se puede determinar y reproducir el color de la superficie representada.

### ESTADO DEL ARTE

La medición de las distancias las realiza el telémetro que es un sensor activo que emite pulsos de luz infrarroja que servirán para determinar la distancia entre el sensor y los puntos del terreno, esta medición está basada en el tiempo de vuelo.

Para ellos utilizamos la tecnología LIDAR: Lidar (Light Detection And Ranging): tecnología que permite determinar la intensidad y la distancia a un objeto o superficie usando pulsos láser. Esta tecnología permite capturar de manera discreta pero a muy alta resolución cualquier elemento en tres dimensiones (3D), de modo que pueda ser analizado digitalmente en un entorno CAD, SIG o BBDD.

Por lo general se mueve realizando pequeños incrementos angulares respecto a su eje vertical, a la vez que toma puntos de arriba a abajo y de abajo a arriba, o bien de manera continua dando vueltas completas respecto a su eje horizontal. El principio básico que utilizan estos aparatos es la distanciometría, es decir, el aparato emite el haz de láser, que rebota en el objeto, y vuelve a recibir el haz. Con el tiempo que tarda en recibirlo calcula la distancia a la que se encuentra el objeto, ya que la velocidad es conocida, la velocidad de la luz. La dirección del haz también es conocida, con lo que se crea un vector con módulo y dirección que da la posición exacta del punto medido, en coordenadas relativas al centro del escáner. Si lo que se busca son coordenadas absolutas se necesitarán las coordenadas del escáner y su orientación, obtenidos mediante distintos sistemas de medida.

Por tanto la precisión de las coordenadas de cada punto dependerá de la precisión que disponga el dispositivo (Márquez, 2010).

### DISEÑO EXPERIMENTAL

Equipamiento. El equipo disponible es el láser escáner ScanStation C10 de Leica. Las características principales del TLS utilizado serían las siguientes:

- Sistema de medición de impulsos.
- Precisión de 2mm.
- Rango de acción que va desde 0,5m a 300m.
- Posee una velocidad de escaneo de 50.000 puntos/s.
- Campo visual de 270° x 360°.

El hecho de que el escáner cuente con una cámara de fotos interna facilita enormemente las labores de postproceso, ya que resulta mucho más fácil discernir ciertos objetos si se cuenta con los valores de color asociados al mismo.

### Descripción del procedimiento:

Si no se ha utilizado el equipo con anterioridad se debe poner en contacto con el técnico para planificar la salida al exterior para la toma de datos. Una vez realizadas dos prestaciones de servicio ya se podrá utilizar el equipo en modo autoservicio si se desea.

El producto generado es una nube de puntos de alta densidad en verdadera magnitud, a partir de la cual podremos realizar cálculos métricos, obtener dibujos, cortes o secciones, vectorizar entidades y modelar los elementos deseados en 2D/3D.

El procesado de los datos capturados por el escáner láser se realiza con el programa Cyclone. Si el proceso se desea realizar en otro programa, siempre existe la opción de importar-exportar la información en cualquiera de los formatos de intercambio estándares que existen en el mercado (ASCII o binario). Además la Unidad también posee licencias de 2 software comerciales muy potentes para el postproceso de los datos 3DReshaper y Polyworks.

## **APLICACIONES**

---

La técnica LIDAR se utiliza para determinar:

- Levantamientos topográficos
- Estudio de cárcavas, erosión de suelo, minas.
- Caracterización de bosques.
- Arquitectura, edificación.
- Documentación y monitorización patrimonial (arquitectónica, obras de arte, arqueológica, etc.)

## **REFERENCIAS**

---

1. MÁRQUEZ, A., 2010. "Un tratado sobre el escáner terrestre TLS". MECINCA. MSEE Columbia University. Nueva York.
2. NUÑEZ ANDRÉS, M.A., BUILL POZUELO, F. y MUÑOZ SALINAS, F. "Comportamiento de un sensor láser escáner" Universidad Politécnica de Cataluña.
3. RAMOS, L., MARCHAMALO, M., REJAS, J. G., MARTÍNEZ, R. (2015). Aplicación del Láser Escáner Terrestre (TLS) a la modelización de estructuras: precisión, exactitud y diseño de la adquisición de datos en casos reales. Informes de la Construcción, 67(538): e074