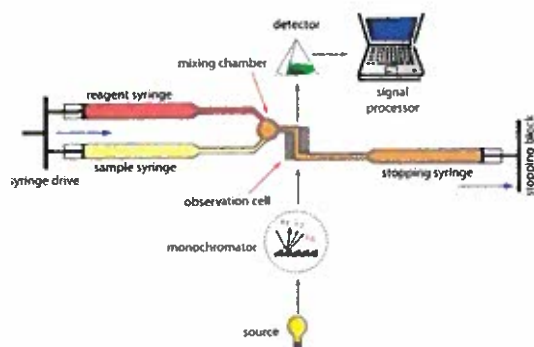


## Programa de uso compartido de instrumento Stopped-Flow (297-InnovatePeru-EC-2016)

### Objetivo del Programa:

El objetivo del Programa de uso compartido de Equipamiento Científico es de contribuir a incrementar el conocimiento científico y el desarrollo tecnológico, mediante la adquisición de un instrumento Stopped-Flow para medición de parámetros cinéticos de reacciones biológicas. El instrumento contribuye para actualizar la infraestructura disponible en el País de manera transversal y multidisciplinaria a diversos programas nacionales prioritarios del CONCYTEC.

### 1. Breve Descripción equipo:



El instrumento Stopped-Flow (SF) permite la medición de cambios espectroscópicos que resultan a partir reacciones moleculares que ocurren muy rápidamente, en el rango de los **milisegundos**. El SF combina **fluídica de alta performance** con **mediciones en tiempo real de absorbancia, intensidad, polarización FRET y tiempo de vida de la fluorescencia**. De esta manera se pueden estudiar **reacciones bioquímicas en tiempo real**, medir las cinéticas en estado pre- y post-estacionario, y así poder elucidar los mecanismos moleculares a la base del funcionamiento de enzimas, reguladores de expresión o la formación de componentes estructurales naturales y sintéticos.

Detectores	Fluorescencia	Intensidad Polarización Tiempo de vida FRET
	Absorbancia	Unica longitud de onda Espectro en tiempo real
	Química	Quench-Flow Análisis bioquímico

### 2. Definición de sesión de uso:

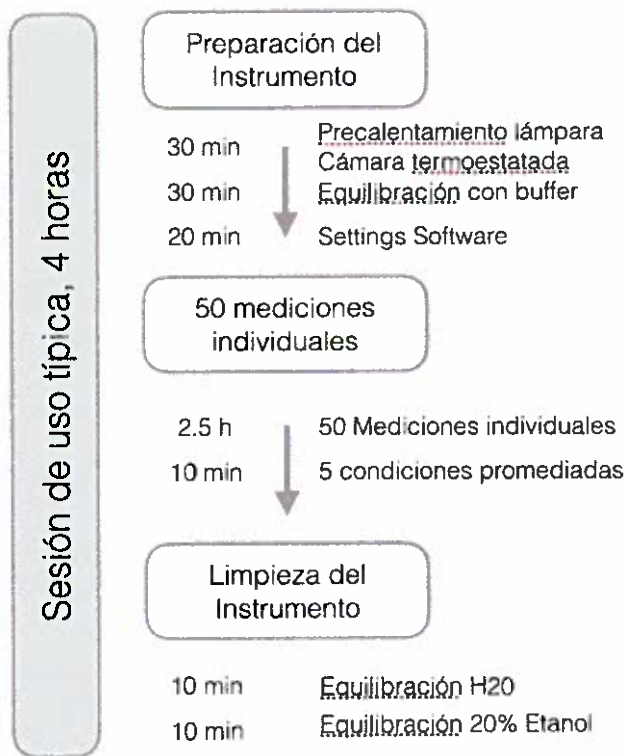
Se entiende como **sesión** el conjunto de acciones que el investigador debe realizar antes, durante y después de cada experimento:

- Preparación del equipo (1 hora): pre-calentamiento de la lámpara, equilibrado del sistema en el buffer de uso, configuración del software
- Medición de replicados de 5 interacciones (50 mediciones individuales) (2.5 horas)
- Limpieza del sistema (0.5 horas)

**Duración:** 4 horas/sesión

**Resultado esperado:** Conjunto de datos descriptivos, mediciones analíticas de alta confianza estadística, responde a una pregunta científica concisa, brinda constantes aparentes de asociación y disociación de moléculas, constantes de disociación, etc.





### 3. Esquema de Proyectos Típicos

A continuación se describen un flujo típico de experimentos de cinética rápida y se estima el número de sesiones experimentales necesarias para las varias fases que lo componen.

#### Fase 1: Determinación de parámetros y configuraciones experimentales

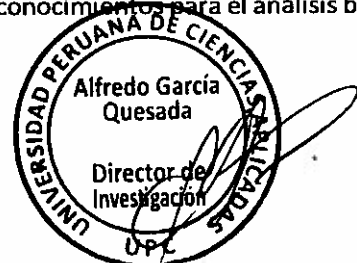
Caracterización de señales de absorbancia o fluorescencia: fluorescencia (Intensidad, polarización, tiempo de vida, FRET) o absorbancia (a única o múltiples longitudes de onda de luz de incidencia)

- Identificación de parámetros espectroscópicos y configuraciones ideales (luz de incidencia, abertura de pasos de luz, voltaje aplicado a detectores, relación señal/ruido al equilibrio) **(2 Sesiones)**
- Identificación de parámetros cinéticos ideales (determinación de tiempos máximos de medición y número de replicados necesarios para obtener una buena correlación de confianza estadística. **(2 Sesiones)**
- Márgenes de confianza experimental (medición de controles positivos, negativos, en ausencia de ligandos, etc). **(4 Sesiones)**
- Asignación de pasos cinéticos y primer bosquejo de mecanismo molecular que describe

**Duración:** 8 sesiones

**Resultados:** Durante la fase 1 el investigador identifica la configuración ideal del sistema, se capacita e independiza para el uso operativo del equipo. En paralelo el investigador también adquiere conocimientos para el análisis básico de sus resultados.

*Alfredo García Quesada*

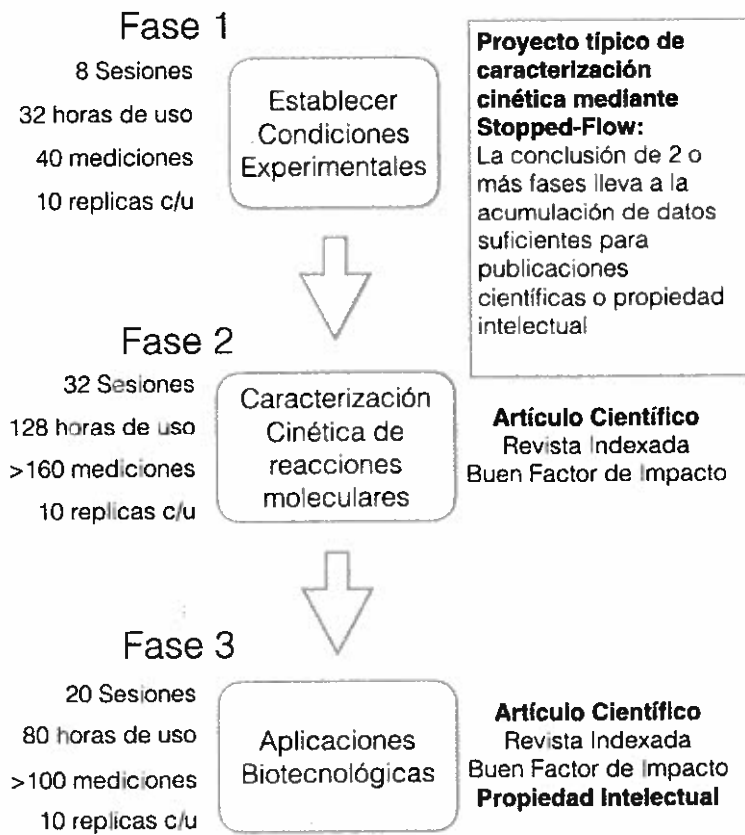


## Fase 2: Caracterización cinética de interacciones moleculares

Tiene como objetivo elucidar mecanismos moleculares a la base del funcionamiento de macromoléculas, proteínas, enzimas, complejos ARN, ARN-proteínas, ADN, ADN-proteínas, etc. A continuación se describe una secuencia típica de análisis:

- Estudiar la relación entre velocidades medidas y concentración de reactivos, substratos, productos, inhibidores **(10 sesiones)**
- Análisis e interpretación de resultados (interacciones simples biomoleculares vs interacciones biomoleculares seguidas de reacciones catalíticas)
- Estudiar la relación entre velocidades medidas y variables físicas/químicas como temperatura o condiciones iónicas de las soluciones **(10 sesiones)**
- Análisis e interpretación de resultados (determinación de componentes termodinámicas que influyen la reacción estudiada)
- Postulación de mecanismos moleculares que mejor describen los datos medidos y mediciones finales **(12 sesiones)**

**Resultados:** Durante la fase 2 el investigador acumula una gran cantidad de datos, analiza los resultados, postula



el modelo cinético que mejor describe sus datos. El investigador adquiere competencias analíticas avanzadas de cinética en estado pre-estacionario. Comprende muy bien el instrumento y es capaz de capacitar a otros investigadores.

## Fase 3: Aplicaciones biotecnológicas



Comparación cinética del efecto de variaciones genéticas, químicas, bioquímicas en un sistema cinéticamente controlado. Se estudia variaciones de ligandos, drogas, antibióticos, compuestos de origen natural o sintético en sus respectivos sitios de unión. El siguiente esquema busca determinar constantes de disociación velocidades de asociación y disociación de compuestos bioactivos. La comparación de estas constantes ayudarían a identificar aquellos con mejor potencial biotecnológico, farmacológico, diagnóstico.

- a. En cada sesión se puede medir propiedades cualitativas de 5-8 compuestos.
- b. La caracterización cinética analítica requiere una sesión por cada compuesto requiere

**Duración:** dependiente del numero de compuestos a estudiar y sus variantes. **20 sesiones** deberían describir 10 compuestos con detalles sin precedentes.

**Resultados Esquemas Experimentales:**

Este esquema genera suficiente información para una **publicación**, especialmente si acompañada de otros datos bioquímicos, **incrementando el impacto** de publicaciones con datos de otros sistemas analíticos. La conclusión de la fase 3 podría llevar a la acumulación de información detallada de moléculas de interés comercial, suficientes para asegurar la propiedad intelectual de ellas.

**4. Costos operativos para el funcionamiento del Instrumento Stopped-Flow:**

- o **NO** requiere kits, consumables, reactivos de marca especifica o cualquier otro gasto operativo específicamente ligado a la marca del instrumento.
- o Bajo costo operativo: electricidad, gas comprimido (8bar)
- o Bajo costo de mantenimiento: Lampara xenón cada 800 horas de uso, balón de gas comprimido cada dos meses a uso intensivo

Table 1: Costo por sesión de uso. \* Calculado en base a un uso máximo del equipo, 2 sesiones de 4 horas al día, 10 sesiones por semana, 40 sesiones al mes, por 24 meses

	Duración	Costo Unitario (S/.)	Nr. de Sesiones	Costo por sesión (S/.)
Lámpara de Xenón	800 horas	S/. 1670	200	S/. 8.4
Balón de Gas Nitrógeno	320 horas	S/. 270	80	S/. 3.4
Mantenimiento Bienal	2 años	S/. 20858	960*	S/. 22
			Total Costo/Sesión	S/. 33.8

Table 2: Costos operativos por proyecto. \*Costo total por sesión = S/. 33.8

Nro. de Sesiones	de Horas	Costo por fase (S/.)
------------------	----------	----------------------




<b>Fase 1: Parámetros y especificaciones experimentales</b>	8	32	S/. 270.4
<b>Fase 2: Caracterización Cinética</b>	32	128	S/. 1081.6
<b>Fase 3: Aplicaciones biotecnológicas</b>	20	80	S/. 676
		<b>Total por Proyecto</b>	<b>S/. 2028</b>

### 5. Proyecciones de uso del equipo:

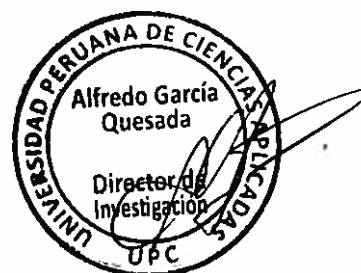
Debido al fuerte componente analítico/teórico que estudios de cinética rápida requieren, se recomienda que cada experimento se analice el mismo día. Esto lleva a un máximo de una sesión de uso del equipo por investigador por día. Pudiendo albergar a 2 sesiones diariamente.

Se considera también que un investigador promedio realizaría 3 sesiones analíticas a la semana, debido a:

- Componente teórico/analítico
- Compromisos académicos de investigadores, alumnos de pre y postgrado
- Movilización en Lima metropolitana es lenta entre sedes de laboratorios colaboradores
- La preparación de muestras, mezclas, protocolos requiere de 2 horas o más previas a la sesión de Stopped-Flow

*Table 3: Número de sesiones por investigación, tiempo de dedicación en función de las diversas fases experimentales. \*se considera un máximo de 3 sesiones experimentales por semana por proyecto*

	Nro de sesiones	Semanas*	Meses*
<b>Fase 1</b>	8	3	1
<b>Fase 2</b>	32	11	4
<b>Fase 3</b>	20	7	2
<b>Total Sesiones/Proyecto</b>	60	Total Meses/Proyecto	6-7

## Proyección y distribución de uso del instrumento

### Proyección de utilización de sesiones en el Stopped-Flow

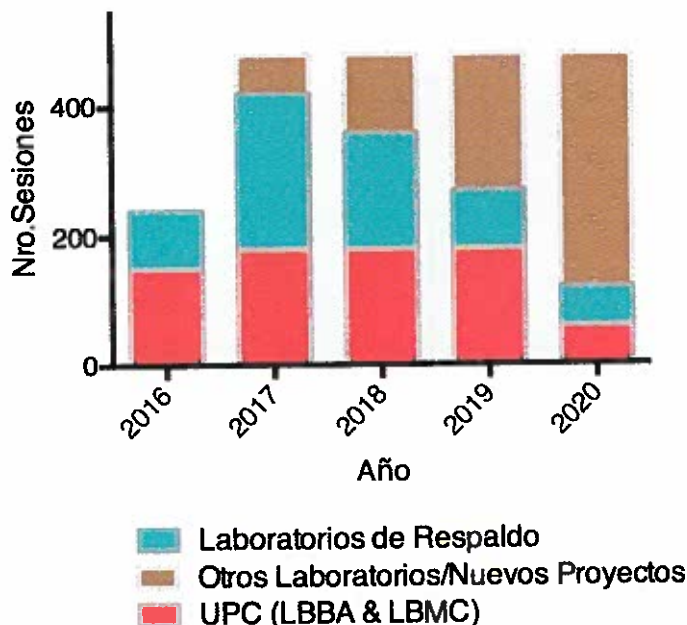


Figure 1: Distribución de sesiones de uso para grupos de investigación de UPC, Laboratorios de respaldo arriba Indicados, y otros laboratorios o proyectos nuevos de aquellos grupos ya familiarizados con el equipo. El listado de proyectos actualmente a disposición aseguran 2 años de uso intensivo del equipo. Cada sesión de uso corresponde a 4 horas de uso

### 6. Condiciones para el uso del equipo por terceros

Se establecen las condiciones que deberán cumplir grupos de investigación externos a UPC para usar el equipo. Entre las condiciones que deberán definirse se encuentran:

- Instituciones que podrán tener acceso al equipo:

Universidades públicas y privadas, laboratorios de investigación, desarrollo tecnológico e innovación, institutos de

investigación, empresas de carácter biomédico, biotecnológico, constituidos en el Perú y el extranjero.

- Para acceder al equipamiento se seguirá el siguiente esquema:
  - Contar con un protocolo de proyecto evaluado y aprobado por un Comité de Ética
  - Compatibilidad del proyecto con un laboratorio de bioseguridad 1
  - Determinación de factibilidad y pertinencia del uso de cinéticas rápidas para el problema científico planteado (Reunión equipo técnico UPC con Investigador, lluvia de ideas)
  - Diseño experimental inicial
  - Capacitación teórica/práctica de utilización del equipo, medidas de seguridad y uso apropiado del equipo. Generalmente de la duración de 1-3 semanas y correspondiente a la fase 1 de un proyecto modelo (Trabajo conjunto del investigador invitado con experto del equipo técnico)
  - Análisis de datos y verificación de factibilidad del proyecto para entrar a las siguientes fases.
- Tiempo disponible semanal/mensual que las instituciones podrán tener acceso al equipo:  
Una vez concordado un plan experimental con el investigador capacitado, este podrá reservar el equipo según calendario y disponibilidad. No se hacen distinciones entre usuarios locales o externos. Sin embargo, en caso de overbooking se penaliza a aquellos usuarios con reservas NO ejecutadas.
- Requisitos de las personas que solicitan el uso.
  - Superado satisfactoriamente la capacitación teórico/práctica
  - Conocimiento del manual buenas prácticas de laboratorio e investigación
  - Un buen entendimiento de una o más de las siguientes materias: enzimología, biología molecular, bioquímica, cinéticas enzimáticas, conceptos básicos de biofísica.
  - Seriedad, orden, limpieza
- Procedimiento para solicitar el uso:



- Disponibilidad de calendario
  - Cronograma de sesiones
  - Autorización de ingreso al campus
- Costo asociado al uso: **Ninguno**

**Accesibilidad al equipamiento:**

Con el objetivo de ampliar y facilitar el acceso al equipo se creó la cuenta de Gmail única con dirección [labb.sx20@gmail.com](mailto:labb.sx20@gmail.com), la cual permite la reserva del equipo a través de google calendar, así como verificar de manera remota la disponibilidad del equipo por todos los usuarios externos a UPC. En todo caso los investigadores interesados pasan por el siguiente proceso:

- Capacitación teórica e informativa sobre la accesibilidad al equipo
- Capacitación de uso del equipo
- Capacitación en manejo de datos y análisis de los mismos

Una vez que el investigador ha sido capacitado, puede reservar y usar el equipo independientemente.

