

SUPUESTO PRÁCTICO A

Pregunta 1

Describe los cálculos necesarios y cómo prepararías 500 ml de la disolución tampón Tris-HCl 0.5 M pH 7.5, sabiendo que el peso molecular del Tris es 120.

Pregunta 2

Recibes una muestra de una bacteria que puede causar una enfermedad en el ser humano, pero es poco probable que se propague y además existe profilaxis o tratamiento eficaz contra ella.

¿Con qué nivel de bioseguridad debes trabajar? Describe **brevemente** los aspectos más importantes de las instalaciones, equipamiento protector y eliminación de residuos.

Pregunta 3

Sospechas que la muestra recibida está contaminada con otra/as bacterias. ¿Cómo aislarías de esa mezcla cultivos puros?, ¿y cómo procederías para distinguir las bacterias gram+ de las gram-?

Pregunta 4

Una vez que te aseguras de tener un cultivo bacteriano puro, necesitas purificar el plásmido con el que fue transformada. Describe el protocolo de la lisis alcalina para la purificación del plásmido.

Pregunta 5

Obtenido el plásmido, ¿cómo lo cuantificarías y determinarías su pureza con respecto a proteínas?

Pregunta 6

Necesitas clonar un gen bacteriano en el plásmido para sobreexpresar la proteína codificada por ese gen. Comenta qué tipo de vector debe ser y sus características. Si deseas clonar el gen para generar una proteína de fusión con EGFP, ¿qué aspecto debes tener en cuenta en el clonaje?

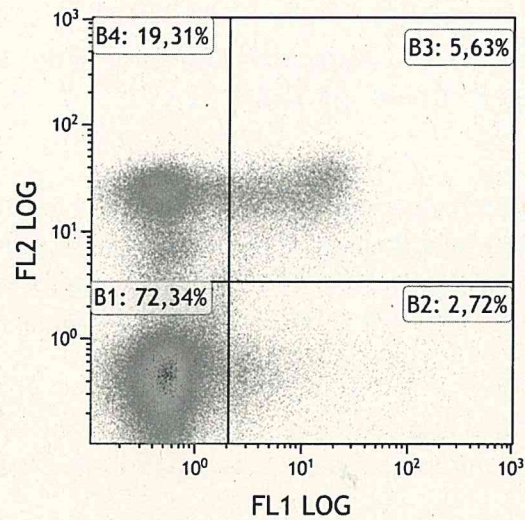
Pregunta 7

Por otro lado, recibes un criovial con una línea celular eucariota congelada. Describe cómo la descongelarías y cultivarías. Al cabo unos días, las células alcanzan la confluencia, ¿cómo harías un pase 1/5? Al finalizar tus experimentos con ella, deseas mantener la línea celular para el largo plazo, ¿cómo procederías?

Pregunta 8

El siguiente gráfico corresponde a tu línea celular tratada con anticuerpos marcados con fluorocromos y analizada por citometría de flujo. Comenta dicho gráfico.

SUPUESTO PRÁCTICO A



Pregunta 9

Dicha línea celular expresa la proteína objeto de tu estudio fusionada a EGFP. ¿Qué tecnología emplearías para localizar subcelularmente la proteína? Describe **brevemente** dicha técnica y la preparación previa de las células.

SUPUESTO PRÁCTICO B

Su laboratorio mantiene en cultivo células Sf9 de insecto transformadas con un báculo, en el que se ha clonado un gen X que codifica una proteína recombinante X. El báculo está diseñado para que la proteína X se exprese acoplada a una etiqueta de 6 histidinas. La proteína pesa 100 kDa. El báculo contiene un cassette de expresión de EGFP. El día que comienza los experimentos, realiza un conteo de las células. Tras el mismo, usted determina que tiene 200ml de cultivo a una concentración de 10^6 células/ml.

Pregunta 1

Explique brevemente cómo valoraría a priori la eficiencia de expresión de las células indicadas usando la EGFP como gen reportero.

Pregunta 2

Se decide confirmar la validez del sistema verificando la identidad del gen X mediante análisis de DNA previo a la purificación de la proteína X. Para el análisis de DNA, usted necesita 10^7 células, y para la purificación de la proteína necesita 10^8 células. Describa cómo prepararía ambas alícuotas de cultivo celular como paso previo a los análisis.

Pregunta 3

Describa un protocolo para obtener cDNA a partir del pellet de 10^7 células.

Pregunta 4

Una vez obtenido el cDNA, describa brevemente los pasos más importantes del protocolo para verificar y amplificar el gen X mediante PCR convencional (la secuencia del gen X es conocida, y disponible en NCBI). Especifique qué reactivos comunes y específicos necesita.

Pregunta 5

Describa los reactivos necesarios y el método genérico de preparación del producto obtenido en la reacción de PCR de verificación para enviar a una empresa externa que realizará la secuenciación Sanger completa del producto. No es necesario especificar concentraciones de trabajo.

Pregunta 6

Describa brevemente los componentes y pasos esenciales de un método para preparar un extracto proteico total a partir del pellet de 10^8 células.

Pregunta 7

Una vez obtenido el lisado clarificado, describa brevemente el protocolo preparativo (es decir, que permita la separación de cantidades suficientes de proteína para su uso en otras aplicaciones) más adecuado para purificar la proteína. La proteína es estable a pH y fuerza iónica fisiológicas. Céntrese en la técnica elegida, el protocolo de purificación y preparación de la proteína para su almacenaje de larga duración.

Pregunta 8

Una vez completada la purificación, la resolución de una muestra del resultado de la purificación por PAGE/SDS revela que su muestra contiene 2 bandas, una de 100 kDa (producto esperado) y otra de 50 kDa (contaminante). Describa brevemente un protocolo preparativo para eliminar la banda contaminante de 50 kDa.

SUPUESTO PRÁCTICO B

Pregunta 9

Explique brevemente un método (**solamente uno**) que se podría usar para confirmar la identidad de la proteína purificada de 100 kDa. Explique muy brevemente los requerimientos mínimos de la técnica elegida, así como sus ventajas y limitaciones.